

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ВАРНА**  
**ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА**  
**КАТЕДРА ПО АКУШЕРСТВО И ГИНЕКОЛОГИЯ**

**Д-р Мария Величкова Юнакова**

**СЛАБ ЯЙЧНИКОВ ОТГОВОР НА КОНТРОЛИРАНА ОВАРИАЛНА  
ХИПЕРСТИМУЛАЦИЯ – ДИАГНОЗА, ПРОГНОСТИЧНИ  
ФАКТОРИ, УПРАВЛЕНИЕ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

Варна, 2016 г.

Дисертационният труд съдържа 215 страници, в които са включени 81 цветни фигури и 66 таблици. Библиографията обхваща 356 литературни източника, от които 8 на кирилица и 348 на латиница. Публикациите, свързани с дисертационния труд са 5.

Проучванията по дисертационни труд са извършени в САГБАЛ „Д-р Щерев“, гр. София.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 15.06.2016 г. от 12.00 ч. в III-та Аудитория на Медицински Университет – Варна, гр. Варна, ул. „Марин Дринов“ № 55.

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на МУ-Варна

[www.mu-varna.bg](http://www.mu-varna.bg)

Медицински университет – Варна, „Проф. Д-р Параскев Стоянов“

Факултет по Медицина, Катедра по Акушерство и гинекология

**Д-р Мария Величкова Юнакова**

**Слаб яйчников отговор на контролирана овариална хиперстимулация  
– диагноза, прогностични фактори, управление**

## **ДИСЕРТАЦИЯ**

*За присъждане на научна и образователна степен “доктор”  
Научна специалност 03.01.45. “Акушерство и гинекология”*

### **Научни ръководители**

Доц. Д-р Атанас Щерев, д.м.н.

Доц. Д-р Емил Ковачев, д.м.н.

### **Официални рецензенти:**

Проф. Д-р Стефан Иванов, д.м.н.

Проф. Д-р Стоимен Иванов, д.м.н.

Варна, 2016 г.

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

AMX (AMH)	- Анти-Мюлеров хормон
ART	- асистиран репродуктивни технологии
AX (AH)	- асистиран хетчинг (assisted hatching)
aGnRH	- аналог на гонадолиберина
БАФ	- брой антрални фоликули
ЕКМТ	- електрокоагулация на маточните тръби
E2	- естрадиол
ЕТ	- ембриотрансфер
EFFORT	- exogenous follicle stimulating hormone ovarian reserve test
GAST	- gonadotrophin releasing hormone agonist stimulation test
ФСХ (FSH)	- фоликулостимулиращ хормон (Follicle stimulating hormone)
hCG	- human chorion gonadotropin
ICSI	- интрацитоплазмена спермална инжекция
IVF	- <i>in vitro</i> оплождане
KOX	- контролирана овариална хиперстимулация
KKOX	- конвенционална контролирана овариална хиперстимулация
ЛЕЛ	- локална ендометриална лезия
ЛН	- лутеинизиращ хормон
МЦ	- менструален цикъл
НЯР	- намален яйчников резерв
PF	- пункция на фоликули
Prog	- прогестерон
ПЯО	- преждевременно яйчничково отпадане
СССТ	- clomiphene citrate challenge test
СЦ	- спонтнен цикъл
СЯО	- слаб яйчников отговор
УЗД	- ултразвукова диагностика
ФТ	- физиотерапия
ЯР	- яйчников резерв
SPSS	- statistical package for the social sciences

## **СЪДЪРЖАНИЕ**

<b>I. ВЪВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>6</b>
<b>II. ЦЕЛ НА ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....</b>	<b>7</b>
<b>II.1. ЦЕЛ.....</b>	<b>7</b>
<b>II.2. ЗАДАЧИ.....</b>	<b>7</b>
<b>III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ.....</b>	<b>8</b>
<b>III.1. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ.....</b>	<b>8</b>
<b>III.2. МЕТОДИ.....</b>	<b>12</b>
<b>III.3. ДРУГИ МЕТОДИ, ИЗПОЛЗВАНИ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....</b>	<b>13</b>
<b>III.4. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ.....</b>	<b>14</b>
<b>IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....</b>	<b>15</b>
<b>IV.1. Анализ на акуратността на маркерите за оценка на ЯР и оценка на прогностичната им стойност по отношение на яйчниковия отговор на КОХ и изхода от АРТ.....</b>	<b>15</b>
<b>IV.2. Анализ на влиянието на фактори, произтичащи от начина на живот като индекс на телесната маса, тютюнопушене и възраст върху ЯР и изхода от АРТ.....</b>	<b>39</b>
<b>IV.3. Анализ на влиянието на прекарани възпалителни заболявания и оперативни интервенции в малкия таз върху ЯР и изхода от АРТ.....</b>	<b>43</b>
<b>IV.4. Анализ на зависимостта между вида на стимулация и дозите на използваните медицименти за стимулация при ККОХ върху яйчниковия отговор.....</b>	<b>51</b>
<b>IV.5. Анализ на приноса на подготвителни терапевтични подходи и съпътстващи техники за подобряване на изхода от АРТ при пациенти със СЯО на КОХ.....</b>	<b>60</b>
<b>V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>69</b>
<b>VI. ИЗВОДИ.....</b>	<b>70</b>
<b>VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....</b>	<b>72</b>
<b>VIII. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....</b>	<b>73</b>

## ВЪВЕДЕНИЕ

*В България няма официална статистика за броя на двойките с репродуктивни проблеми. По данни на количествено „Изследване на проблемите на репродуктивното здраве”, проведено през Септември 2013 г. от МБМД, двойките с репродуктивни проблеми в България са над 70 000. Предполагамата цифра от Фондация „Зачатие” е дори още по-тревожна – 135 хиляди двойки. В същото време, по данни на електронния регистър на ражданията в България, през 2015 г. в страната са родени най-малко бебета от 1945 г. насам – едва 65 950. На базата на екстраполация на броя на извършените през 2015 г. процедури по асистирана репродукция и постигнатите от тях бременности в САГБАЛ „Д-р Щерев”, София можем да твърдим, че за изминалата година в България са извършени около 10 хиляди инсеминационни и „ин-витро” процедури, от които ще се родят около 2500 – 3000 бебета, т.е. около 5% от ражданията у нас през годината ще са заченати от асистирани репродуктивни технологии (АРТ). Това предполага, че в бъдеще ролята на АРТ в борбата с негативните демографски тенденции, ще е значителна.*

*Слабият яйчников отговор (СЯО) на контролирана овариална хиперстимулация (КОХ) е пряко следствие от намаления яйчников резерв на жената (НЯР). Това са състояния, които представляват изключително голямо предизвикателство пред специалистите по репродуктивна медицина и са много актуални през последните години. Броят на жените с НЯР в клиниките за лечение на стерилитет нараства прогресивно през последните десетилетия. Свързано с промените в обществено-икономическия живот и нарастващата урбанизация и еманципация, е непрекъснатото изместване на възрастта, на която жените стартират или желаят да продължат репродуктивните си планове в цяла Европа. Не е пренебрежимо значението на негативните тенденции в промяната на начина на живот и свързаните с него вредни навици с пряко отражение върху репродуктивния потенциал и на жените и на мъжете – застоял начин на живот и обездвижване и свързаните с това наднормено тегло и патологично затлъстяване, тютюнопушене, консумация на алкохол, урбанизация на населените места и съсредоточаването на населението в големите градове с високи нива на замърсяване, стрес. Свързано с урбанизирания начин на живот е все по-широкото разпространение на ендометриозата – заболяване, което по различни механизми причинява репродуктивни затруднения и инфертилитет. Наблюдава се и подмладяване на злокачествените заболявания, което налага провеждането на агресивна химио- и/или лъчетерапия при млади хора преди да са реализирали репродуктивните си намерения. Тази животоспасяваща терапия, обаче, засяга необратимо качествения и количествения яйчников резерв.*

*Тази ситуация изправя специалистите по репродуктивна медицина пред предизвикателството да предложат оптимални мерки за повишаване шансовете на пациентите с НЯР и респективно СЯО на КОХ за създаване на потомство. Това предполага необходимостта от създаване на алгоритъм за управление на тези пациенти, чрез предлагане на оптимален диагностичен подход за своевременното им откриване и прогнозиране на яйчниковия отговор на КОХ и предлагане на оптимален за всеки конкретен случай индивидуален подход.*

## **II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

### **II. 1. ЦЕЛ**

**ЦЕЛТА** на дисертационния труд е да се направи обстоен анализ на причините и проявленията на СЯО на КОХ за целите на АРТ, както в количествен, така и в качествен аспект, да се намерят най-коректните маркери за оценка на състоянието и да се предложи оптимален алгоритъм за управлението му.

### **II. 2. ЗАДАЧИ**

1. Да се оцени коректността на маркерите за оценка на количествения и качествен ЯР, използвани в клиничната практиката
2. Да се предложи диагностичен пакет за прогнозиране на яйчниковия отговор на КОХ и изхода от АРТ и за избор на оптимален терапевтичен подход
3. Да се изследва зависимостта между фактори, произтичащи от начина на живот и ЯР – индекс на телесната маса, тютюнопушене, възраст
4. Да се изследва зависимостта между прекарани възпалителни заболявания и оперативни интервенции в малкия таз върху ЯР
5. Да се анализира влиянието на факторите от т. 3 и 4 не само върху количествения, но и върху качествения ЯР, чрез оценка на качеството на добитите при АРТ яйцеклетки и процента постигнати бременности
6. Да се оцени ефективността на различни терапевтични подходи:
  - 6.1. подготвителни – физиотерапия, прием на хранителни добавки и витамини, ЛЕЛ
  - 6.2. вид стимулационен протокол и дози за хормонална стимулация
  - 6.3. прилагане на съпътстващи техники – ко-култивиране, АХ, ЕТ на 2-ри ден
7. Да се изработи алгоритъм за управление на СЯО, чрез категоризиране на пациентите по групи със сходни характеристики и прилагане на оптимално поведение във всяка група

### **III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

#### **III. 1. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ.**

##### **III. 1. 1. Обща характеристика на работния материал.**

За изпълнението на поставените задачи и постигането на набелязаната цел в проучването са включени 2721 жени, които са провели лечение на стерилитет с методите на асистираната репродукция и са достигнали до фоликуларна пункция в Медицински комплекс „Д-р Щерев“ за периода от Януари 2013 г. до Декември 2015 г.

В зависимост от оценяваните фактори, включените в проучването жени са разпределени в няколко групи, при всяка от които са решавани специфични задачи.

##### **III. 1.2. Основни групи на работния материал.**

###### **III. 1.2.1. Маркери на яйчниковия резерв.**

По отношение на маркерите за оценка на ЯР и анализ на тяхната акуратност, за всеки отделен маркер жените са разпределени в няколко групи, в които са изследвани среден брой добити яйцеклетки след ККОХ, среден брой атретични яйцеклетки и дял на атретичните яйцеклетки от общия брой добити в проценти, като качествен маркер на ЯР и процент клинични бременности.

За да се оцени още по-точно информативността на всеки от изследваните маркери на ЯР и да се потвърди надеждността на получените резултати, жените са разделени на три групи според вида отговор на ККОХ: със слаб отговор на ККОХ с добити под 5 яйцеклетки, със задоволителен отговор на ККОХ с добити между 5 и 10 яйцеклетки и с добър отговор на ККОХ с добити над 10 яйцеклетки и са сравнявани средните стойности на всеки отделен маркер по групи.

###### **а) Възраст.**

Женската възраст традиционно се разпознава като главен предопределящ изхода от АРТ фактор (53, 54). Анализирани 1992 жени, разпределени в четири възрастови групи по критериите, възприети от групата за IVF мониторинг към Европейската асоциация по човешка репродукция и ембриология: група 1  $\leq 30$  г., група 2 - 31 – 34 г., група 3 - 35 – 39 г., група 4  $\geq 40$  г. ;

###### **б) БАФ.**

Оценката на БАФ е извършена при 1925 жени чрез трансвагинално ултразвуково сканиране на броя на малките антрални фоликули между 2 и 10 мм в яйчниците в ранната фоликуларна фаза. Изброяват се БАФ в двата яйчника. По отношение на макера БАФ, пациентите са разделени на три групи: група 1 - под 5 БАФ, група 2 - между 5 и 10 БАФ и група 3 - над 10 БАФ.

###### **в) АМХ.**



Антимюлеровият хормон, възприеман като най-надеждния и удобен маркер за ЯР, е изследван в серума при 206 жени. В изследваната група той е изследван в интервала между 3-ти и 5-ти ден на МЦ. В зависимост от серумните стойности на АМХ, жените са разпределени в 3 групи: група 1 < 1 ng/ml, група 2 - 1-2 ng/ml, група 3 > 2 ng/ml;

#### **г) ФСХ.**

Серумните нива на FSH в ранната фоликуларна фаза – между 3-ти и 5-ти ден на МЦ, като достъпен и евтин тест, са изследвани при 652 жени. В зависимост от стойностите на хормона, жените са разпределени на три групи: група 1 < 8.5 IU/l, група 2 – 8.5 – 12 IU/l, група 3 > 12 IU/l;

#### **д) Съотношение FSH/LH.**

При 609 пациентки е изследвана прогностичната му стойност като маркер на ЯР, като жените са разпределени в четири групи, в опит да се намерят критичните стойности: група 1 < 1, група 2 – 1-1.5, група 3 – 1.5 – 2, група 4 > 2.

#### **е) Инхибин Б.**

Серумните нива на Инхибин Б също са изследвани в ранната фоликуларна фаза между 3-ти и 5-ти ден на МЦ при 124 жени. Жените са разпределени в две групи според стойностите на маркера: група 1 – под 50 pg/ml, група 2 – над 50 pg/ml.

### **III. 1.2.2. Фактори, повлияващи ЯР.**

По отношение на анализирането на факторите, които биха могли да повлияят качествения и количествения потенциал на яйчника, са изследвани средният брой добити яйцеклетки след ККОХ, като количествен показател и средният брой добити и процент от общия брой атретични яйцеклетки и процент бременности, като показател за качествения капацитет на яйчника. Изследвано е влиянието на прекараните възпалителни процеси в малкия таз и абдоминални оперативни интервенции, фактори свързани с начина на живот – индекс на телесната маса и тютюнопушене.

#### **а) Индекс на телесната маса.**

Изчислява се като съотношение между теглото в кг и височината в метри на квадрат (кг/м<sup>2</sup>) и не зависи от възрастта. Влиянието на индекса на телесната маса върху ЯР е изследвано при 1211 жени, като са сравнени стойностите на показателите за ЯР в 4 групи според индекса на телесна маса, възприети от СЗО, 1995 г.: група 1 ИТМ < 18,5, група 2 ИТМ - 18,5-24,9, група 3 ИТМ - 25 – 30, група 4 ИТМ > 30.

#### **б) Тютюнопушене.**

Изследвани са 733 жени, които са разделени на две групи – 441 пушещи (60,2%) и не пушещи 292 (39,8%), без статистически достоверна разлика в средната възраст, която е съответно 36 г. и 35 г. и те са сравнени по показателите на ЯР.

#### **в) Възпалителни процеси в малкия таз.**

За оценка на влиянието на прекараните възпалителни процеси в малкия таз върху количествения и качествен резерв на яйчника, са сравнени горевизираните показатели след ККОХ при 1349 жени, разделени на две групи: група 1 - с тубарен фактор, диагностициран с хистеросалпингография или лапароскопия и група 2 – с мъжки фактор като причина за стерилитета, без данни за прекарани възпалителни процеси в малкия таз. Средната възраст в двете изследвани групи е еднаква – 35 г.

#### **г) Абдоминални оперативни интервенции.**

В настоящото проучване е сравнено влиянието на оперативните интервенции в коремната кухина и малкия таз върху ЯР. Анализирани са 1226, които са разделени в 2 групи – с и без оперативни интервенции в коремната кухина. Средната възраст в двете изследвани групи е еднаква – 35 г.

Сравнени са и показателите на ЯР при жените, претърпели оперативна интервенция по повод на ретгистриран хидросалпингс, като е проучено засягането на ЯР при различни оперативни подходи – електрокоагулация на истмичната част на маточната тръба за изолиране на комуникацията между хидросалпингса и маточната кухина и салпингектомия. Изследвани са 98 (85,2%) жени преминали салпингектомия и 17 (14,8%) жени претърпели ЕКМТ.

### **III. 1.2.3. Терапевтични подходи.**

Различните терапевтични подходи са разделени на три групи – подготвителни, стимулация – вид и дози и съпътстващи техники. Отново са изследвани средният брой на добитите яйцеклетки след КОХ, средният брой на атретичните яйцеклетки и процентният им дял от общия брой добити и/или процента на клиничните бременности.

#### **а) Подготвителни**

#### **б)**

Подготвителните терапевтични мероприятия, чрез различни въздействия, главно повишаване притока на кръв към малкия таз и антиоксидантно действие, имат за цел да подобрят функцията и потенциала на фоликуларния апарат на яйчника и условията за имплантация. Изследвана е ефективността на няколко мерки - физиотерапевтични процедури, хранителни добавки и витамини.

Анализът на резултатите от проведените физиотерапевтични процедури на малкия таз в комбинация с перорално приемани хранителни добавки с андрогенно действие DHEA, комбинирани витамини и микроелементи, има проспективен характер. Данните за тях са получени анамнестично и/или от отделението по Физиотерапия и рехабилитация към Медицински комплекс „Д-р Щерев“. Такава е проведена при 506 пациентки, като е проведен поне едномесечен курс в месец, предшестваш началото на КОХ. Сравнени са показателите на ЯР при жените с и без проведени физиотерапевтични процедури, преминали ККОХ.

## **б) стимулация - вид и дози на използваните медикаменти.**

### **• Вид стимулация**

При пациентите е проведена три вида стимулация: ККОХ по два основни протокола - дълъг протокол и протокол с антагонист на гонадолиберина, минимална стимулация и спонтанен цикъл. Сравнен е яйчниковият отговор и процента на клиничните бременности в трите групи, като са изследвани общо 2653 жени. Жените отново са разпределени в четири възрастови групи по критериите, възприети от групата за IVF мониторинг към Европейската асоциация по човешка репродукция и ембриология: група 1  $\leq 30$  г., група 2 - 31 – 34 г., група 3 - 35 – 39 г., група 4  $\geq 40$  г.;

### **• Дози на използваните медикаменти**

В групата на жените провели ККОХ, обхващаща 1484 жени, е отчетен ефектът на различните дози на FSH препаратите за стимулация върху яйчниковия отговор в качествен и количествен аспект, като показателите са сравнени в четири групи максимални дози на използваните FSH препарати: 1-ва група  $< 1500$  Е, 2-ра група 1500 – 3000 Е, 3-та група 3000 – 4500, 4-та група  $> 4500$  Е.

## **в) Съпътстващи техники**

Това са техники, които касаят ембриологичният етап от ин витро процедурите. Имат отношение към условията за делене на ембрионите, тяхната имплантация и потенциал за развитие в развиваща се клинична бременност. При тях се отчита само процента на клиничните бременности, тъй като не повлияват ЯР. На прилагането им се залагат надежди да оптимизират условията за настъпване на бременности при пациенти с НЯР и малък брой ембриони.

### **• Ко-култивиране и ЛЕЛ**

Ко-култивиране е приложено при 87 жени, преминали КОХ и е сравнен изхода от процедурата при пациентки с и без тази манипулация, като е сравнен процента на клиничните бременности.

### **• АХ**

АХ е приложен при 143 жени, преминали ККОХ и е сравнен изхода от процедурата при пациентки с и без тази манипулация, като е сравнен процента на клиничните бременности. Разгледана е ефективността на техниката и в група само на жени със СЯО.

### **• Ден на ЕТ.**

При 221 пациентки е изследвана ефикасността на провеждане на ЕТ на 2-ри, 3-ти или 5-ти ден след фоликуларната пункция и е отчетен процента клинични бременности в различните групи.

## III.2. МЕТОДИ

В проучването са използвани методи, характерни за всеки отделен етап от IVF и ICSI/IMSI процедурите.

### **I етап – Селекция на пациенти**

При селекцията на пациенти за включване в IVF/ICSI/IMSI програмите са приложени следните методи:

1. **Клинично изследване**
2. **Тестове за овулаторна функция**
3. **Тестове за тубарна проходимост**
4. **Тестове за диагностика на мъжката оплодителна способност:**

### **II етап – Подготовка на пациентките**

1. Гинекологичен преглед.
2. **Методи за образна диагностика – трансвагинално ултразвуково изследване.**

3. **Лабораторни методи:** изследване на пълна кръвна картина, кръвна група,  $CE \leq 15 \text{ mm/h}$ , изследвания за вирусен хепатит (HBV, HCV), HIV и Wass, определяне на базални серумни нива на FSH [mIU/ml], LH [mIU/ml], Prol [ng/ml] и E2 [pg/ml], AMX [ng/ml], Inhibin B [pg/ml].

4. **Физиотерапия и подготвителна терапия:** интерферентни токове, магнитотерапия, лазертерапия, ултразвукова терапия.

### **III етап – Провеждане на КОХ – методи за стимулация на овариалния цикъл**

1. **Конвенционална КОХ** по дълъг протокол или протокол с антагонист на гонадолиберина.

Конвенционална КОХ на 1484 включени в проучването жени се проведе с гонадотропни хормони от втория ден на менструалния цикъл.

### **2. Минимална стимулация.**

По преценка на лекуващия лекар на базата на оценката на яйчниковия резерв и предшестващ опит, при 339 жени е проведена минимална стимулация по т.нар. лимитиран цикъл с прилагане перорално на Clomiphen Citrate (EGIS Pharmaceuticals PLS, Hungary) или Femara (Novartis Pharma GmbH, Germany) в ранната фоликуларна фаза и добавяне за няколко дни на екзогенни гонадотропни хормони (326).

Отново за избягването на преждевременна лутеинизация е прилаган *антагонист на GnRH* при наличие на водещ фоликул 12-13 mm;

### **3. Спонтанен цикъл.**

При 348 пациенти, по преценка на лекуващия лекар или при наличие на контраиндикации за прилагане на стимулация, е проследяван спонтанно растящия фоликул в цикъла, без прилагане на медикаменти за стимулация.

#### **IV етап – Мониториране на яйчниковия отговор**

1. Трансвагинално ехографско проследяване на фоликуларния растеж (брой, големина и темп на нарастване), както и промените в ендометриума от 5-ти ден на МЦ.

2. Мониторинг на хормоналните стойности от ден 5-ти на МЦ **E2** [pg/ml], **LH** [mIU/ml] и **Prog** [pg/ml] през ден.

#### **V етап – Инвазивни методи**

##### **Пункция на фоликули и аспирация на яйцеклетките**

Независимо от стимулационния протокол, за таймиране на овулацията използвахме препарат с LH активност, който аплицирахме 24 часа след последната гонадотропинова инжекция, при наличие на поне 3 фоликула с диаметър над 17 mm. Пункцията извършвахме не по-късно от 34-36-тия час след приложение на 5 000 - 10 000 IU i.m. hCG - Pregnyl® (Organon, Netherland) and Choriomon (IBSA Farmaceutici Italia, Italy) или Ovitrelle 6500 E s.c. (Merk Serono Europe Ltd, UK). Аспирацията на яйчниковите фоликули става в гинекологично положение на пациентката след влагалищен тоалет с физиологичен разтвор. Под ехографски контрол с игла 16-18 G, дълга 330 mm и аспирационен сет на фирмите (Labotec, Wallace, Cook) се пунктират и аспирират фоликулите над 14 mm двустранно.

#### **VI етап – Биологични методи**

С аспирацията на яйцеклетките и обработката на сперматозоиди чрез методите “swim up” и Percoll започва *биологичния етап* от процедурата. Той осигурява възможност за оплождане и ранен ембрионален растеж при специални лабораторни условия.

#### **VII етап – Ембриотрансфер**

След култивиране на ембрионите до определен стадий се извършва оценка на тяхното развитие и се преминава към трансфера им в маточната кухина.

##### **Оценка на ембрионите и селекция за трансфер**

#### **VII етап – Диагноза, проследяване и терапия на ранната бременност**

Клинично развиващите се бременности се доказваха ехографски, чрез установяване на гестационен сак и ембрионална сянка със сърдечна дейност.

### **III.3. ДРУГИ МЕТОДИ, ИЗПОЛЗВАНИ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

#### **Ко-култивиране и ЛЕЛ**

Ендометриална биопсия или локална ендометриална лезия е извършвана по време на лутеалната фаза на МЦ, предхождащ АРТ процедурата. Извършва се с щрих – катетър, който се въвежда в маточната кухина през цервикалния канал и с вакуум-аспирация се

аспирират ендометриални клетки. Пробите се подлагат обработка. Получената клетъчна суспензия подготвя за ко-култивиране с ембриони. Зиготите се поставят върху монослой от автоложни ендометриални стромални клетки в деня след фоликуларната пункция и се култивират съвместно до момента на ембриотрансфера.

#### **Асистиран хетчинг**

Асистиран хетчинг с лазер се извърши с използването на Zona Infrared laser Optical System с 1.48 мм инфрачервен диоден лъч.

### **III.4. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ**

- 1. Предварителна обработка на данните.**
- 2. Дескриптивна статистика.**
- 3. Проверка на условията за приложение на параметрични тестове.**
- 4. Тестове за различие.**
- 5. Дисперсионен анализ.**
- 6. Корелационен анализ.**
- 7. Анализ на честотите.**
- 8. Графично представяне на резултатите.**

#### **IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ**

Резултатите от направените собствени проучвания са систематизирани в пет отделни раздела:

1. Анализ на акуратността на маркерите за оценка на ЯР и оценка на прогностичната им стойност по отношение на яйчниковия отговор на КОХ и изхода от АРТ.
2. Анализ на влиянието на фактори, произтичащи от начина на живот като индекс на телесната маса, тютюнопушене и възраст върху ЯР и изхода от АРТ.
3. Анализ на влиянието на прекарани възпалителни заболявания и оперативни интервенции в малкия таз върху ЯР и изхода от АРТ.
4. Анализ на зависимостта между вида на стимулация и дозите на използваните медикаменти за стимулация при ККОХ върху яйчниковия отговор.
5. Анализ на приноса на подготвителни терапевтични подходи и съпътстващи техники за подобряване на изхода от АРТ при пациенти със СЯО на КОХ.

##### **IV. 1. Анализ на акуратността на маркерите за оценка на ЯР и оценка на прогностичната им стойност по отношение на яйчниковия отговор на КОХ и изхода от АРТ.**

За оценка на коректността на различните маркери на ЯР са изследвани 1992 жени, провели ККОХ по протокол с антагонист на гонадолиберина или дълъг протокол и преминали фоликуларна пункция за периода Януари 2013г. – Декември 2015 г. в Медицински комплекс „Д-р Щерев“. За оценка на точността на всеки от изследваните маркери на ЯР да прогнозира отговора на КОХ в количествен аспект, е изследван средният брой на добитите при фоликуларна пункция яйцеклетки. С цел потвърждаване на силата на всеки от изследваните маркери за оценка на ЯР и особено за възможността му да прогнозира яйчниковия отговор на КОХ, бе извършено изследване и сравнение на стойностите на всеки от маркерите при различен тип яйчников отговор на ККОХ – слаб отговор с добити под 5 яйцеклетки, задоволителен отговор с добити между 5 и 10 яйцеклетки и добър отговор с добити над 10 яйцеклетки.

За оценка на възможността на изследваните маркери да прогнозират яйчников потенциал в качествен аспект, за всеки от маркерите е изследван средният брой на добитите атретични яйцеклетки и процентния им дял от общия брой на добитите яйцеклетки.

За всеки от изследваните маркери е изследвана способността му сам по себе си да прогнозира изхода от АРТ, като е отчетен процента на постигнатите клинични бременности след АРТ.

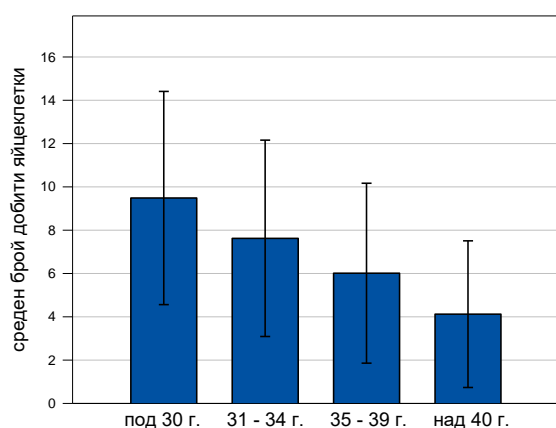
Изборът на АРТ процедура - IVF/ICSI/IMSI и прилагането на допълнителни техники като асистиран хетчинг, ко-култивиране, ЛЕЛ, MACS и др. е съобразен с вида, давността и етиологията на стерилитета при отделните двойки и е подчинен на строги медицински индикации и стандартни оперативни процедури.

#### IV.1.1. Възраст.

Възрастта може да се изследва както за маркер на ЯР, така и като фактор, свързан с начина на живот, който повлиява ЯР. Тъй като възрастта традиционно се възприема като доста точен прогностичен маркер за изхода от АРТ (350), сме решили систематично да я разгледаме в този раздел.

По отношение на възрастта, жените са разделени в 4 възрастови групи по критериите, възприети от групата за IVF мониторинг към Европейската асоциация по човешка репродукция и ембриология:  $\leq 30$  г.; 31 – 34 г.; 35 – 39 г.;  $\geq 40$  г. (Табл. 1).

Табл. 1. Основни статистически показатели на СБЯ при различните възрастови групи



Фиг. 1 Сравнение между възрастовите групи по средния брой добити яйцеклетки

възраст	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
до 30 г.	394	0	30	9.5	0.25	4.9	9
от 31 до 34 г.	473	0	27	7.6	0.21	4.5	7
от 35 до 39 г.	695	0	22	6	0.16	4.2	5
над 40 г.	430	0	24	4.1	0.16	3.4	3

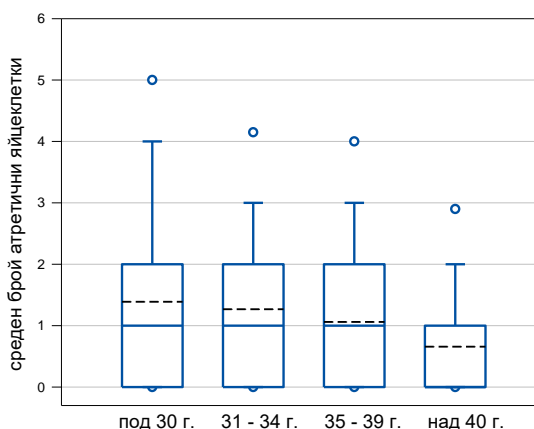
От така проведения анализ, тестът на Kruskal-Wallis доказва статистически достоверни различия между възрастовите групи по отношение на средния брой добити яйцеклетки ( $H = 361.8, p < 0.001$ ). Наблюдава се изразено намаляване на средния брой на добитите след ККОХ яйцеклетки с възрастта (Фиг. 1). Категоричността на тази обратно пропорционална зависимост между възраст и брой добити яйцеклетки се потвърждава от откриването на статистически значима разлика между всяка от изследваните групи - множественото сравнение по метода на Dunn доказва различия между всички двойки възрастови групи ( $p < 0.05$ ).

Връзката между възрастта и делът на атретичните яйцеклетки от общия брой добити яйцеклетки е изследвано при 1949 жени (Табл. 2).



Табл. 2. Основни статистически показатели на броя атретични яйцеклетки при различните възрастови групи

възраст	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
до 30 г.	391	0	14	1.4	0.09	1.8	1.0
от 31 до 34 г.	467	0	12	1.3	0.08	1.6	1.0
от 35 до 39 г.	679	0	14	1.1	0.06	1.5	1.0
над 40 г.	412	0	6	0.7	0.05	0.9	0.0



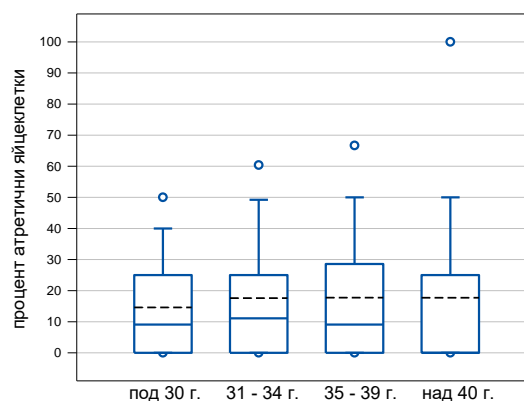
Фиг. 2. Сравнение между възрастовите групи по броя атретични яйцеклетки

Анализът на разпределението на атретичните яйцеклетки също показва намаление на средния им брой с нарастване на възрастта на жената, реципрочно на общата тенденция на намаление на общия брой добити яйцеклетки, представено с пунктир на Фиг. 2. Непараметричният дисперсионен анализ показва достоверни различия по броя атретични яйцеклетки между групите ( $H = 44.4$ ,  $p < 0.001$ ).

Като дялово разпределение на атретичните яйцеклетки в различните възрастови групи, обаче, не се наблюдава значима разлика (Табл. 3), т.е. техният дял в различните възрастови групи остава еднакъв - различията между възрастовите групи по процента атретични яйцеклетки са недостоверни ( $H = 4.8$ ,  $p = 0.185$ ) (Фиг. 3).

Табл. 3. Основни статистически показатели на процента атретични яйцеклетки при различните възрастови групи

възраст	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
до 30 г.	391	0	100	14.6	0.88	17.5	9.1
от 31 до 34 г.	467	0	100	17.6	1.03	22.2	11.1
от 35 до 39 г.	679	0	100	17.8	0.89	23.2	9.1
над 40 г.	412	0	100	17.7	1.30	26.5	0.0



Фиг. 3. Сравнение между възрастовите групи по дела атретични яйцеклетки

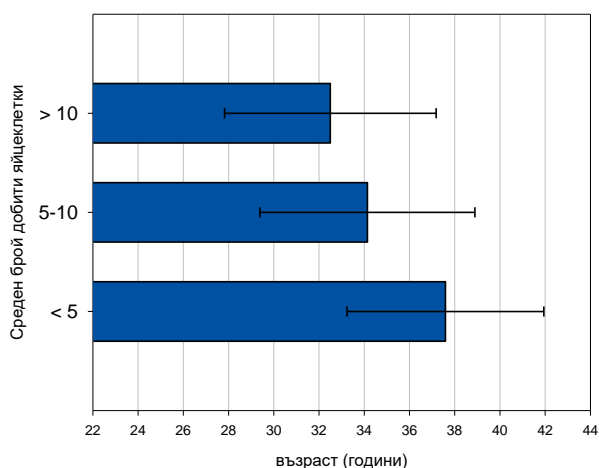
Друг подход, използван да анализира корелацията между възрастта и честотата на добиване на атретични яйцеклетки, изследва възрастовото разпределение сред жените, при които след КОХ са добити изцяло (100%) атретични яйцеклетки. Резултатите показват ясна тенденция – само 2% от жените с добити изцяло атретични яйцеклетки са под 30 г., почти по равно са жените от възрастовите групи 31 – 34 г. и 35 – 39 г., респ. 25,5% и 29,4% и почти половината от жените с изцяло добити атретични яйцеклетки са над 40 г., а именно 43,1%. Установената зависимост е статистически достоверна ( $\chi^2 = 17,94$ ,  $p < 0.001$ ).

Изследването на типа яйчников отговор на КОХ и връзката му с възрастта потвърждава данните за обратнопропорционалната зависимост между среден брой добити яйцеклетки и възраст (Фиг. 4).

При пациентките със слаб яйчников отговор средната възраст е 37,6 г., в групата със задоволителен отговор на КОХ тя е 34,1 г. и респективно най-млада – 32,5 г. в групата с добити над 10 яйцеклетки. Групите пациентки с различен отговор на стимулация се различават достоверно по средна възраст ( $H = 335$ ,  $p < 0.0001$ ) (Табл. 4).

Табл. 4. Основни статистически показатели на възрастта на пациентките с различен отговор на стимулация

СБЯ	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
< 5	783	19	47	37.6	0.16	4.4	38
5 - 10	836	20	46	34.1	0.16	4.8	34
> 10	373	18	45	32.5	0.24	4.7	32



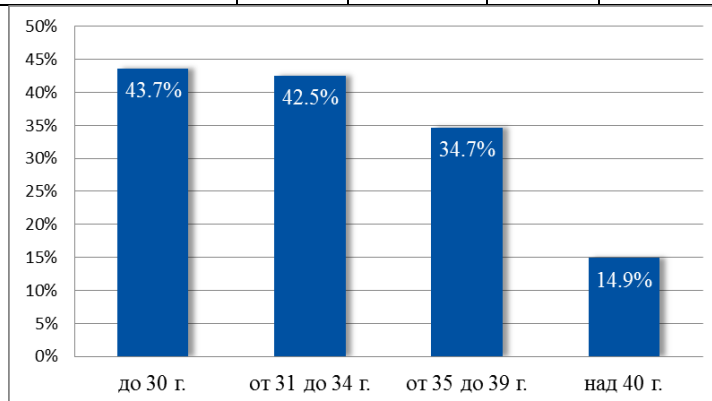
Фиг. 4. Сравнение на възрастта на пациентките с различен отговор на стимулация

Очаквано анализът на данните за постигнатите клинични бременности в различните възрастови групи показва ясна тенденция на намаляване на техния дял с нарастването на възрастта на жените (Табл. 5).

Процентът на постигнатите клинични бременности в двете възрастови групи до 35 г. е приблизително еднакъв, без статистически доказана разлика, респективно 43.7% и 42.5%. В групата над 35 г. се запазва все още много добър за АРТ 34.7%, но намалява сигнификантно спрямо първите две групи. Във възрастовата група над 40 г. изходът от АРТ също се различава достоверно от останалите групи и е едва 14.9% ( $\chi^2 = 69.5$ ,  $p < 0.001$ ) (Фиг. 5).

Табл. 5. Честота на бременностите (в брой и процент) при отделните възрастови групи

възраст	бременности			
	да		не	
	брой	%	брой	%
до 30 г.	138	43.7%	178	56.3%
от 31 до 34 г.	157	42.5%	212	57.5%
от 35 до 39 г.	179	34.7%	337	65.3%
над 40 г.	42	14.9%	239	85.1%



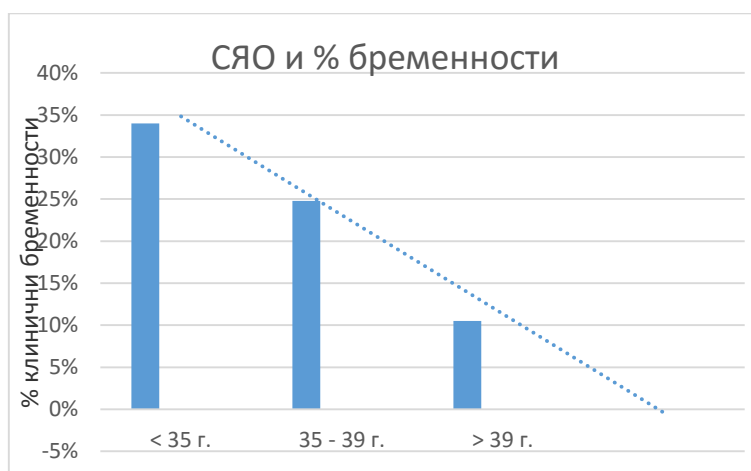
Фиг. 5. Сравнение между възрастовите групи по процента бременности

Резултатите по отношение на клиничните бременности в различните възрастови групи не следват плавната тенденция на обратна корелация, наблюдавана по отношение на броя на яйцеклетките. В групата на младите жени до 30 г. и между 31 и 34 г., независимо от сигнификантната разлика в добитите яйцеклетки, процентът клинични бременности е сравним. Това предполага, че дори и при по-малко на брой яйцеклетки, поради доброто качество на яйцеклетките и ендометриум и респ. условията за имплантация при младите жени, процентът бременности е еднакво добър. С напредването на възрастта на жената – над 34 г., тези условия се променят. При жените над 40 г. възраст процентът на клиничните бременности рязко спада, по-изразено в сравнение с степента на намаляването на СБЯ. Вероятната причина за тези резултати е високата честота на хромозомни и генетични дефекти в яйцеклетките, намаляването на енергийния им потенциал и субоптимални условия за имплантация.

Запазването на еднакво процентно съотношение на атретичните яйцеклетки във всяка от възрастовите групи предполага, че делът на атретичните яйцеклетки от общия брой добивани яйцеклетки е постоянен и еднакъв. Този факт се оказва критичен при малък общ брой добити яйцеклетки при пациентите със СЯО и това намалява чувствително субстрата за ембриони за селекция и трансфер и респективно шансът им за бременност.

За оценка на влиянието на възрастта върху изхода от АРТ и в частност при пациентите със СЯО (под 5 яйцеклетки), е проведено проучване върху 295 жени на възраст между 21 и 45 години, при които са проведени 348 IVF/ICSI процедури с ККОХ. Жените са разделени в три възрастови групи – до 35 г. (n=112), 35 – 39 г. (n=141) и над 39 г. (n=95). Отчита се статистически достоверно по-голям процент бременности при младите жени – 38/112 (34%) в сравнение с другите две възрастови групи, при които процентът бременности е респективно 35/141 (24,8%) и 10/95 (10,5%) ( $p=0,0097$ ). В

следващите две групи няма достоверно различие, но тенденцията на по-голям процент бременности в по-младата група, е ясна (Фиг. 6).



Фиг. 6. Влияние на възрастта върху клиничните бременности при СЯО.

Получените резултати показват по безспорен начин, че шансовете за бременност при СЯО на КОХ в различните възрастови групи е значимо различен и консултирането на пациентите трябва да е съобразено с тези резултати.

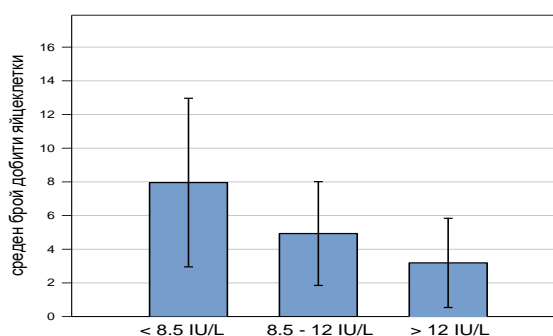
#### IV.1.2. Фоликулостимулиращ хормон (FSH).

Серумните нива на Фоликулостимулиращия хормон са най-рутинно използваният и разпознаваем от акушер-гинеколозите в България маркер за оценка на яйчниковата функция и ЯР. Възприет е като маркер на ЯР от Центъра за асистирана репродукция и е залегнал като лимитиращ публичното финансиране на ин-витро процедури. ФСХ е достъпен – може да се изследва във всяка лаборатория и е евтин. Неудобството му е, че както повечето т.нар. базални хормони може да се изследва само в ранната фоликуларна фаза на цикъла – 3-ти – 5-ти ден на МЦ и не е стабилен маркер – бележи интерменструални вариации (218).

Според стойностите на ФСХ 652 пациентки са разделени на три групи: < 8.5 IU/L; 8.5 – 12 IU/L; > 12 IU/L (Табл. 6).

Табл. 6. Основни статистически показатели на СБЯ при групите според стойността на ФСХ (IU/L)

ФСХ	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
до 8.5 IU/L	447	0	26	8.0	0.24	5.0	7.0
от 8.5 до 12 IU/L	157	0	16	4.9	0.25	3.1	4.0
над 12 IU/L	48	0	14	3.2	0.38	2.6	2.0



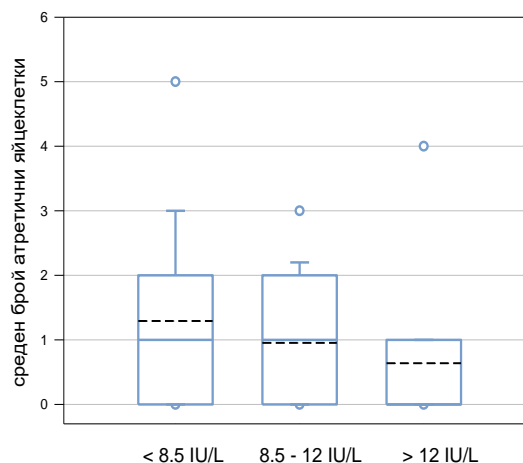
Фиг. 7. Сравнение между групите според стойността на ФСХ (IU/L) по СБЯ

Зависимостта между средния брой на добитите яйцеклетки след ККОХ и серумните нива на ФСХ е обратно пропорционална, като различията между трите групи са достоверни ( $H = 88.4$ ,  $p < 0.001$ ). Прави впечатление по-отчетливо намаляване на средния брой на добитите яйцеклетки още след покачване на стойностите на FSH над 8.5 IU/L, въпреки че традиционно за критични се възприемат по-високи стойности на хормона (Фиг. 7).

По отношение на средния брой на добитите атретични яйцеклетки (Табл. 7) и делът им от общия брой добити (Табл.8), се отчита намаляване на средният им брой с повишаване на стойностите на ФСХ, реципрочно на намаляването на общия брой добити яйцеклетки, с достоверна разлика само в двете крайни групи ( $H = 9.78$ ,  $p = 0.008$ ) (Фиг. 8) и липса на статистически значима разлика в делът им в трите групи ( $H = 1.84$ ,  $p = 0.398$ ) (Фиг. 9).

Табл. 7. Основни статистически показатели на броя атретични яйцеклетки при групите според стойността на ФСХ (IU/L)

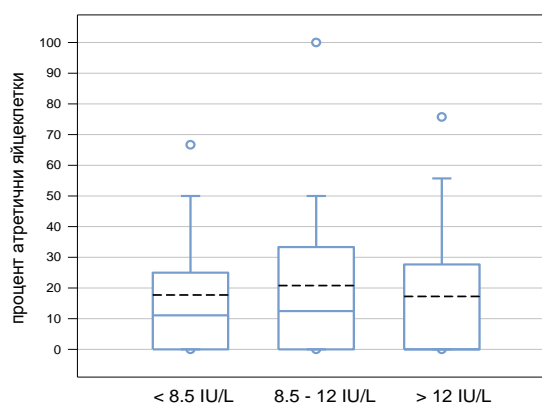
ФСХ	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
до 8.5 IU/L	441	0	14	1.3	0.09	1.8	1.0
от 8.5 до 12 IU/L	153	0	6	1.0	0.09	1.1	1.0
над 12 IU/L	47	0	5	0.6	0.16	1.1	0.0



Фиг. 8. Сравнение между групите според стойността на ФСХ (IU/L) по броя атретични яйцеклетки

Табл. 8. Основни статистически показатели на дела атретични яйцеклетки при групите според стойността на ФСХ (IU/L)

FSH	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
до 8.5 IU/L	441	0	100	17.8	1.09	23.0	11.1
от 8.5 до 12 IU/L	153	0	100	20.8	2.20	27.2	12.5
над 12 IU/L	47	0	100	17.3	3.92	26.9	0.0

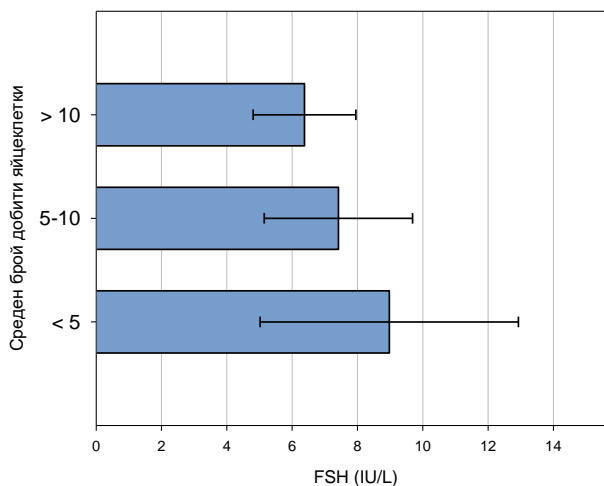


Фиг. 9. Сравнение между групите според стойността на ФСХ (IU/L) по дела атретични яйцеклетки

Сравнението на серумните нива на ФСХ в групите на жените с различен отговор на стимулация показва достоверно нарастване на средната стойност на хормона с намаляване на броя на добитите при КОХ яйцеклетки (Табл. 9 и Фиг. 10) ( $H = 72.1$ ,  $p < 0.0001$ ).

Табл. 9. Основни статистически показатели на стойността на FSH (IU/L) при пациентки с различен отговор на стимулация

	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
< 5	255	1.16	32.96	8.97	0.25	3.95	8.36
5 - 10	277	2.72	20.39	7.42	0.14	2.27	7.10
> 10	120	3.34	12.33	6.38	0.14	1.57	6.32



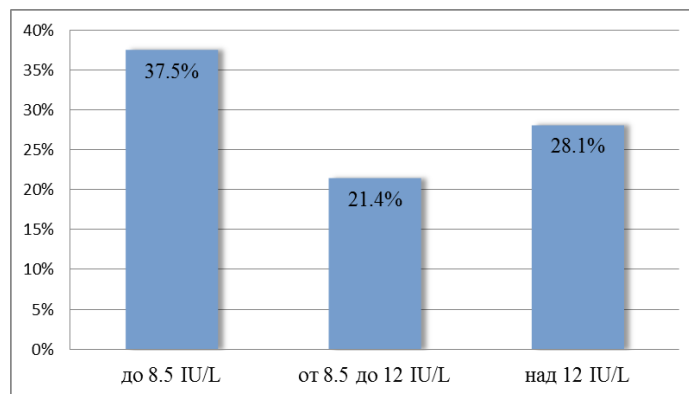
Фиг. 10. Сравнение на стойностите на ФСХ (IU/L) при пациентки с различен отговор на стимулация

Процентът на постигнатите клинични бременности след КОХ също намалява при нива на ФСХ над 8.5 IU/l, т.е. следва тенденцията на влошаване на показателите както при СБЯ (Табл. 10).

Табл. 10. Честота на бременностите (в брой и процент) при групите според стойността на ФСХ (IU/L)

FSH	бременности			
	да		не	
	брой	%	брой	%
до 8.5 IU/L	129	37.5%	215	62.5%
от 8.5 до 12 IU/L	24	21.4%	88	78.6%
над 12 IU/L	9	28.1%	23	71.9%

Статистически достоверна разлика се установява между процента клинични бременности в групата на жените с ФСХ до 8.5 IU/l от една страна и този в следващите две групи с ФСХ над 8.5 IU/l ( $\chi^2 = 69.5$ ,  $p = 0.006$ ). Стойности на хормона над 8.5 IU/l се свързват с влошаване на показателите както по отношение на очаквания отговор на хормонална стимулация, така и по отношение на постигнатите бременности (Фиг. 11).



Фиг. 11. Процент бременности при групите според стойността на ФСХ (IU/L)

Получените резултати предполагат, че използването на ФСХ като прогностичен маркер за ЯР и изхода от АРТ трябва да бъде критично и да се занижат критичните стойности, над които очакваме лош изход от АРТ.

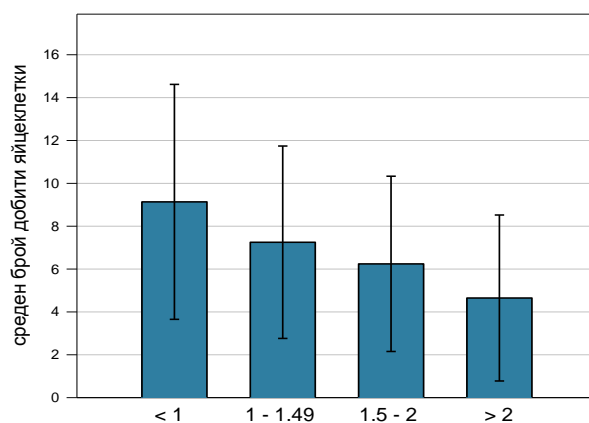
### VI.1.3. Съотношение FSH/LH.

Предидшни клинични наблюдения на екипа оформиха хипотезата, че съотношението FSH/LH може да бъде информативен и надежден маркер за ЯР в сравнение с други маркери. По този показател жените бяха разделени на 4 групи: < 1; 1-1.5; 1.51-1.99; > 2 (Табл. 11).

Направеният анализ показва, че изследваните групи се различават достоверно по средния брой добити яйцеклетки ( $H = 60.6$ ,  $p < 0.0001$ ). Сравнителният анализ по метода на Dunn доказва достоверни различия при стойности на съотношението под 1, между 1 и 2 и над 2, които могат да се възприемат като критични (Фиг. 12).

Табл. 11. Основни статистически показатели на СБЯ при групите според съотношението FSH/LH

FSH/LH	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
до 1	138	1	25	9.1	0.47	5.5	8
от 1 до 1.49	240	0	26	7.3	0.29	4.5	7
от 1.5 до 2	120	0	23	6.2	0.37	4.1	5.5
над 2	111	0	16	4.6	0.37	3.9	4

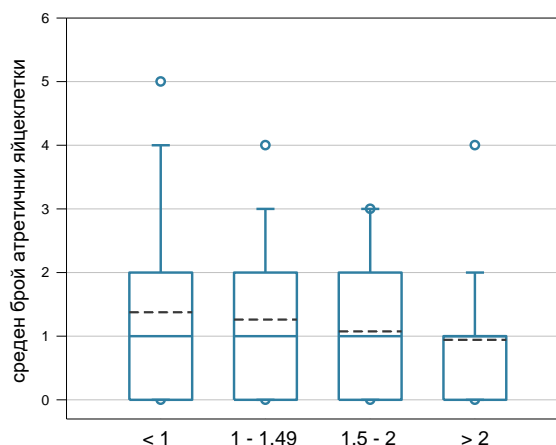


Фиг. 12. Сравнение между групите според съотношението FSH/LH по СБЯ

Изследванията по отношение на броя ( $H = 2.41$ ,  $p = 0.492$ ) (Табл. 12) и дела на атретичните яйцеклетки от общия брой добити яйцеклетки ( $H = 2.41$ ,  $p = 0.492$ ) (Табл. 13) не показаха статистически значима разлика между изследваните групи (Фиг. 13, Фиг. 14).

Табл. 12. Основни статистически показатели на броя атретични яйцеклетки при групите според съотношението FSH/LH

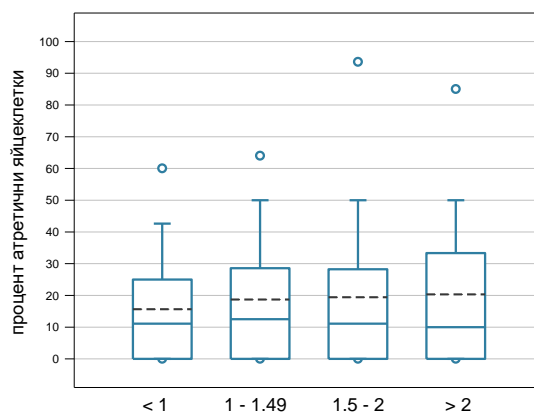
FSH/LH	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
до 1	138	0	14	1.4	0.18	2.1	1
от 1 до 1.49	240	0	14	1.3	0.11	1.7	1
от 1.5 до 2	120	0	6	1.1	0.12	1.3	1
над 2	111	0	6	0.9	0.12	1.3	1



Фиг. 13. Сравнение между групите според съотношението FSH/LH по броя атретични яйцеклетки

Табл. 13 Основни статистически показатели на процента атретични яйцеклетки при групите според съотношението FSH/LH

FSH/LH	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
до 1	138	0	100	15.6	1.81	21.2	11.1
от 1 до 1.49	240	0	100	18.7	1.52	23.4	12.5
от 1.5 до 2	120	0	100	19.4	2.36	25.8	11.1
над 2	111	0	100	20.3	2.60	26.6	10.0



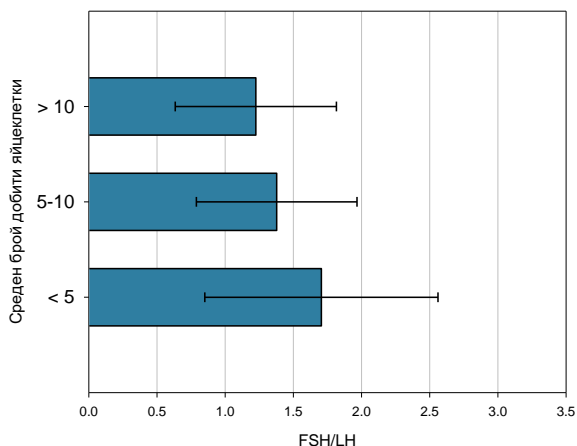
Фиг. 14. Сравнение между групите според съотношението FSH/LH по дела атретични яйцеклетки

Изследването на зависимостта между съотношението FSH/LH и типа яйчников отговор, отчете статистически достоверни различия между трите групи ( $H = 42.8$ ,  $p < 0.0001$ ) (Табл. 14), като потвърждава данните за намаляване на броя на добитите яйцеклетки с нарастването на съотношението (Фиг. 15).



Табл. 14. Основни статистически показатели на съотношението FSH/LH при пациентки с различен отговор на стимулация

	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
< 5	228	0.14	5.71	1.71	0.06	0.86	1.52
5 - 10	265	0.24	4.37	1.38	0.04	0.59	1.25
> 10	116	0.24	3.43	1.22	0.05	0.59	1.08

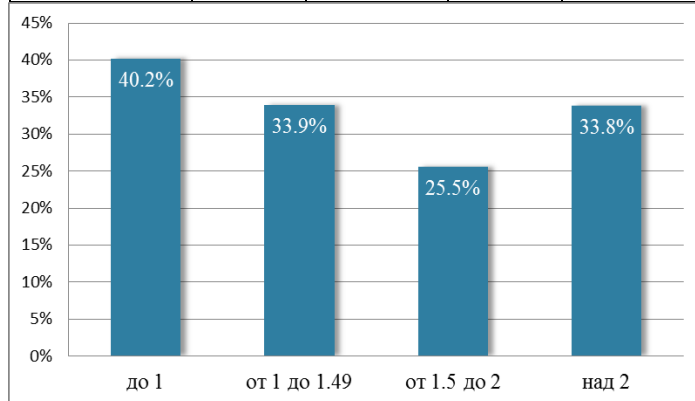


Фиг. 15. Сравнение на съотношението FSH/LH при пациентки с различен отговор на стимулация

По отношение изходът от АРТ, измерен в процента на постигнатите клинични бременности (Табл. 15), съотношението FSH/LH се оказва, че няма прогностична стойност - тестът на Pearson не доказва различия по процента бременности ( $\chi^2 = 5.0$ ,  $p = 0.174$ ) (Фиг. 16).

Табл. 15. Честота на бременностите (в брой и процент) при групите според съотношението FSH/LH

FSH/LH	бременности			
	да		не	
	брой	%	брой	%
до 1	43	40.2%	64	59.8%
от 1 до 1.49	62	33.9%	121	66.1%
от 1.5 до 2	25	25.5%	73	74.5%
над 2	24	33.8%	47	66.2%



Фиг. 16. Процент бременности при групите според съотношението FSH/LH

Анализът на данните по отношение на съотношението FSH/LH показва статистически достоверна корелация със средния брой на добитите яйцеклетки, но само в крайните групи – под 1 и над 2, без да има корелация с процента постигнати бременности и атретични яйцеклетки. Това го прави по-малко надежден и удобен прогностичен маркер на ЯР, доколкото налага необходимостта от изследването и на серумните нива на LH.

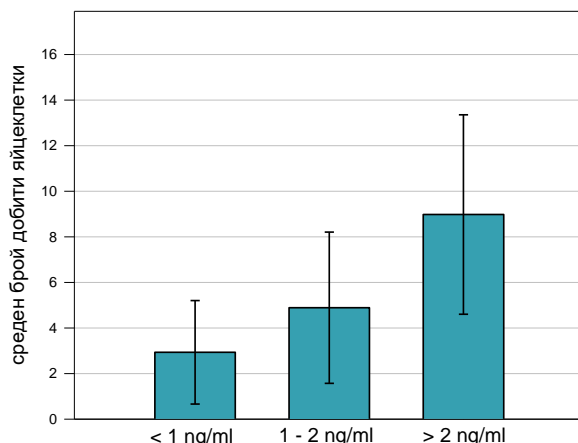
#### VI.1.4. AMX.

Серумните нива на AMH се възприемат като един от съвременните и надеждни маркери за ЯР (248, 249, 352). Неговото удобство е, че може да се изследва във всяка фаза на МЦ, тъй като не търпи интраменструални вариации и е стабилен в различните месеци (5). Тъй като е сравнително по-скъп от други тестове и не се изследва в цялата мрежа от лаборатории, е с ограничена достъпност. В зависимост от стойностите на AMX, жените са разпределени в три групи: < 1 ng/ml; 1-2 ng/ml; > 2 ng/ml.

По отношение на средните стойности на добитите след КОХ яйцеклетки в трите групи се наблюдава статистически достоверно различие (Табл. 16 и Фиг. 17) ( $H = 70.7$ ,  $p < 0.001$ ), с подчертано по-голям брой яйцеклетки в групата на жените с AMX над 2 ng/ml.

Табл. 16. Основни статистически показатели на СБЯ при групите според стойността на AMX.

AMX	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
до 1 ng/ml	90	0	12	2.9	0.24	2.3	2.0
от 1 до 2 ng/ml	64	0	17	4.9	0.41	3.3	4.0
над 2 ng/ml	52	1	24	9.0	0.61	4.4	9.0

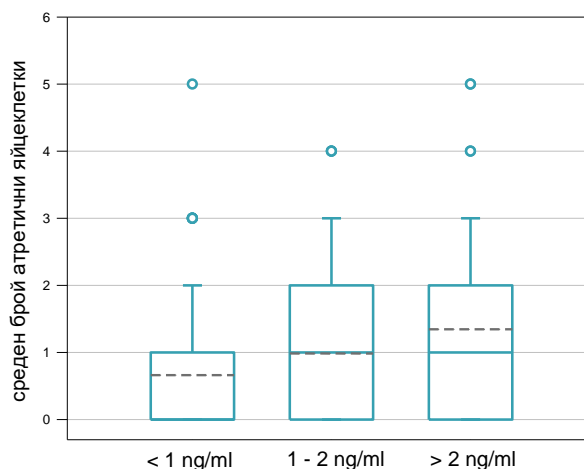


Фиг. 17. Сравнение между групите според стойността на AMX по СБЯ

Средният брой на атретичните яйцеклетки (Табл. 17) следва разпределението на средния общ брой добити яйцеклетки в трите изследвани групи, а именно намаляването им с намаляването на нивата на AMX, като също са налице статистически достоверни различия ( $H = 8.9$ ,  $p = 0.012$ ) (Фиг. 18). Делът на атретичните яйцеклетки в трите групи (Табл. 18) се запазва еднакъв – без достоверни различия ( $H = 0.49$ ,  $p = 0.781$ ) (Фиг. 19).

Табл. 17. Основни статистически показатели на броя атретични яйцеклетки при групите според стойността на AMX

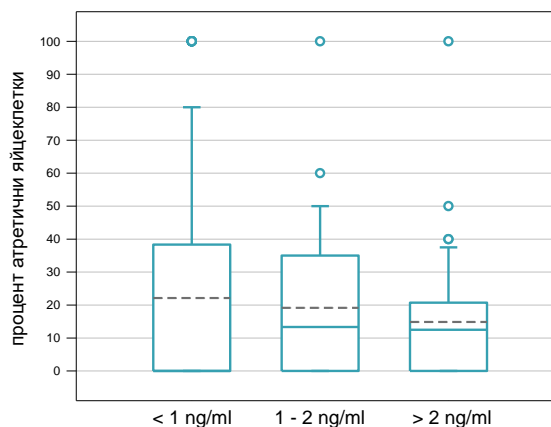
AMX	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
до 1 ng/ml	90	0	5	0.7	0.11	1.0	0.0
от 1 до 2 ng/ml	64	0	4	1.0	0.15	1.2	1.0
над 2 ng/ml	52	0	5	1.3	0.20	1.4	1.0



Фиг. 18. Сравнение между групите според стойността на AMX по броя атретични яйцеклетки

Табл. 18. Основни статистически показатели на процента атретични яйцеклетки при групите според стойността на AMX

AMX	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
до 1 ng/ml	90	0	100	22.1	3.58	32.6	0
от 1 до 2 ng/ml	64	0	100	19.2	2.83	22.1	13.3
над 2 ng/ml	52	0	100	14.9	2.49	17.9	12.5

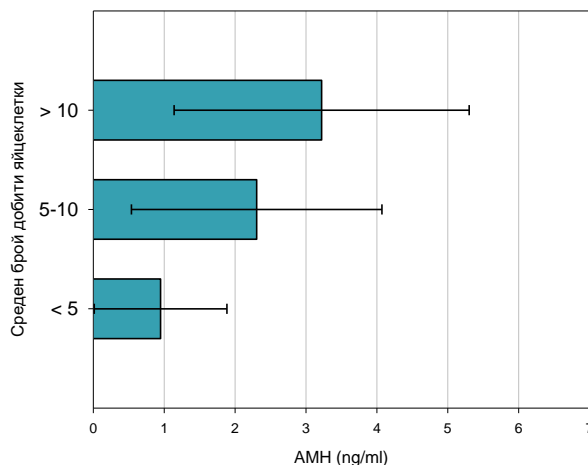


Фиг. 19. Сравнение между групите според стойността на AMX по дела атретични яйцеклетки

Средните стойности на AMX в групите с различен тип отговор на КОХ показват изразени различия (Табл. 19), които са статистически достоверни в групата на жените със слаб яйчников отговор ( $H = 55.4$ ,  $p < 0.0001$ ) (Фиг. 20). Това прави AMX чувствителен прогностичен маркер за ЯР и особено за намалял ЯР.

Табл. 19. Основни статистически показатели на стойността на АМХ при пациентки с различен отговор на стимулация

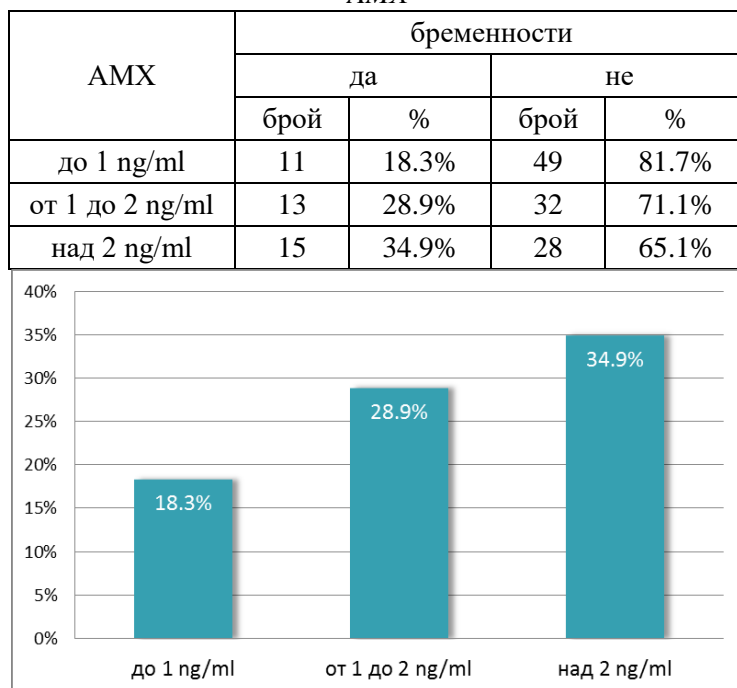
	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
< 5	118	0.08	4.55	0.95	0.09	0.94	0.70
5 - 10	67	0.10	7.30	2.31	0.22	1.77	1.68
> 10	21	0.24	8.00	3.22	0.45	2.08	3.10



Фиг. 20. Сравнение на стойностите на АМХ при пациентки с различен отговор на стимулация

АМХ не се оказва достоверен прогностичен маркер за изхода от АРТ – в изследваните групи не се установява статистически достоверна разлика в процента постигнати бременности ( $\chi^2 = 3.75$ ,  $p = 0.153$ ), въпреки че прави впечатление изразена тенденция на нарастване на процента бременности с нарастване на нивата на хормона (Табл. 20, Фиг. 21).

Табл. 20. Честота на бременностите (в брой и процент) при групите според стойността на АМХ



Фиг. 21. Процент бременности при групите според стойността на АМХ

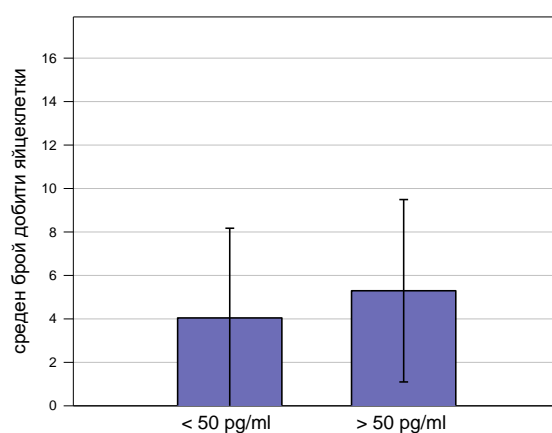
#### IV.1.5. Инхибин Б.

Инхибин Б е серумен маркер, който по подобие на повечето базални хормони, търпи интраменструални вариации и трябва да се изследва в ранната фоликуларна фаза на МЦ (230, 231, 232). Неговото изследване също е ограничено поради цена и предлагане. По изследваните параметри, жените са разделени в две групи според стойностите на хормона: < 50 pg/ml и над 50 pg/ml.

По отношение на средния брой на добитите яйцеклетки, тестът на Mann-Whitney доказва достоверни различия между групите ( $U = 1369$ ,  $p = 0.027$ ) (Табл. 21) – налице е правопрпорционална зависимост между СБЯ и нивата на Инхибин Б (Фиг. 22).

Табл. 21. Основни статистически показатели на СБЯ при групите според стойността на Инхибин Б

Инхибин Б	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
до 50 pg/ml	46	0	19	4.0	0.61	4.1	2.5
над 50 pg/ml	78	0	24	5.3	0.48	4.2	4.0

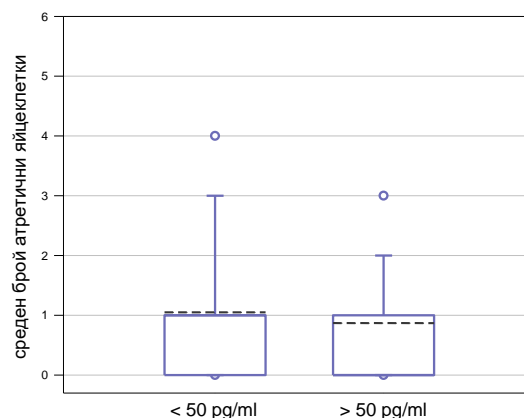


Фиг. 22. Сравнение между групите според стойността на Инхибин Б по СБЯ

Изследването на средния брой на добитите атретични яйцеклетки (Табл. 22) и делът им от общия брой добити (Табл. 23), Инхибин Б не се оказва прогностичен маркер – не се установяват статистически достоверни различия между изследваните групи ( $U = 1402$ ,  $p = 0.464$ ) и респективно ( $U = 1351$ ,  $p = 0.297$ ) (Фиг. 23 и 24).

Табл. 22. Основни статистически показатели на броя атретични яйцеклетки при групите според стойността на Инхибин Б

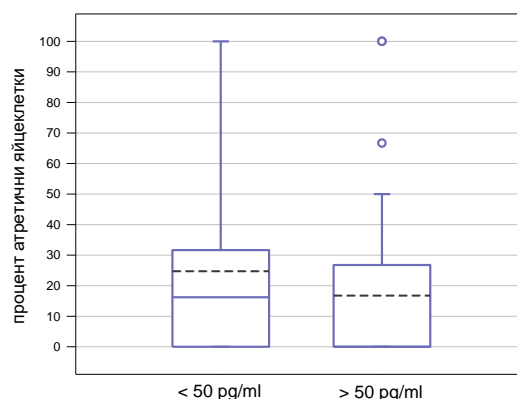
Инхибин Б	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
до 50 pg/ml	40	0	5	1.1	0.21	1.3	1.0
над 50 pg/ml	76	0	5	0.9	0.13	1.1	0.0



Фиг. 23. Сравнение между групите според стойността на Инхибин Б по броя атретични яйцеклетки

Табл. 23. Основни статистически показатели на процента атретични яйцеклетки при групите според стойността на Инхибин Б

Инхибин Б	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
до 50 pg/ml	40	0	100	24.7	5.14	32.5	16.2
над 50 pg/ml	76	0	100	16.8	2.61	22.8	0.0

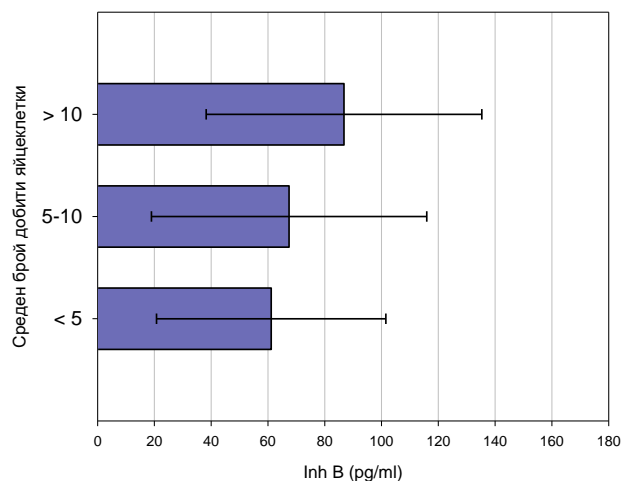


Фиг. 24. Сравнение между групите според стойността на Инхибин Б по процента атретични яйцеклетки

Сравнението на зависимостта на средните стойности на изследваната субстанция и типа яйчников отговор на КОХ (Табл. 24) не показва достоверни разлики между групите – средните стойности на Ихибин Б се запазват сравними независимо от яйчниковия отговор на стимулация, въпреки че е налице ясна тенденция на намаляване на средната му стойност при по-малък брой на яйцеклетките (Фиг. 25).

Табл. 24. Основни статистически показатели на стойността на Инхибин Б при пациентки с различен отговор на стимулация

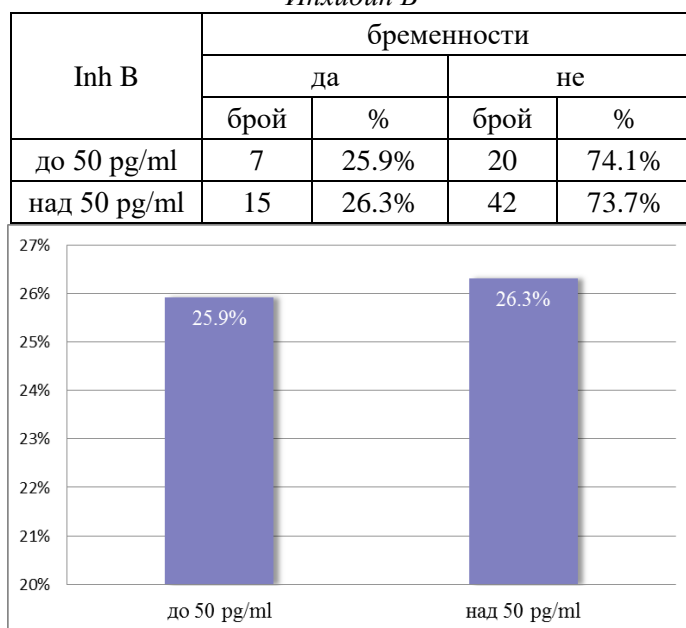
	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
< 5	75	1.00	177.80	61.14	4.66	40.37	62.92
5 - 10	37	1.80	190.44	67.45	7.97	48.47	60.01
> 10	12	1.32	161.50	86.78	14.01	48.54	91.64



Фиг. 25. Сравнение на стойностите на Инхибин Б при пациентки с различен отговор на стимулация

Инхибин Б не се оказва прогностичен и по отношение на процента на постигнатите бременности ( $\chi^2 = 0.052$ ,  $p = 0.820$ ) (Табл. 25, Фиг. 26).

Табл. 25. Честота на бременностите (в брой и процент) при групите според стойността на Инхибин Б



Фиг. 26. Процент бременности при групите според стойността на Инхибин Б

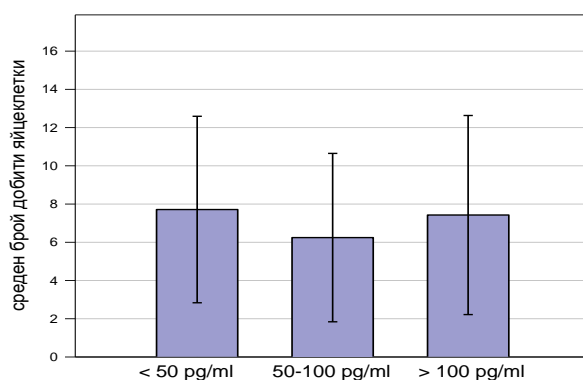
#### IV.1.6. Естрадиол (E2).

Изследването на серумните нива на E2 в ранната фоликуларна фаза е стандартна практика, въпреки че през годините данните за неговата информативност и прогностична стойност за изхода от АРТ са противоречиви (226, 227). По отношение на базалните стойности на хормона, жените са разделени на три групи: < 50 pg/ml; 50 – 100 pg/ml; > 100 pg/ml.

Изследването на отговора на КОХ и средния брой добити яйцеклетки, се наблюдават статистически достоверни различия само между първа и втора група с нива на хормона респективно под и над 50 pg/ml ( $H = 12.8$ ,  $p = 0.002$ ) (Табл. 26), като се установи по-малък среден брой на добитите яйцеклетки с нарастване на нивата на хормона (Фиг. 27).

Табл. 26. Основни статистически показатели на СБЯ при групите според стойността на E2

E2	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
под 50 pg/ml	217	0	26	7.7	0.33	4.9	7.0
от 50 до 100 pg/ml	266	0	20	6.2	0.27	4.4	5.0
над 100 pg/ml	94	1	23	7.4	0.54	5.2	7.0

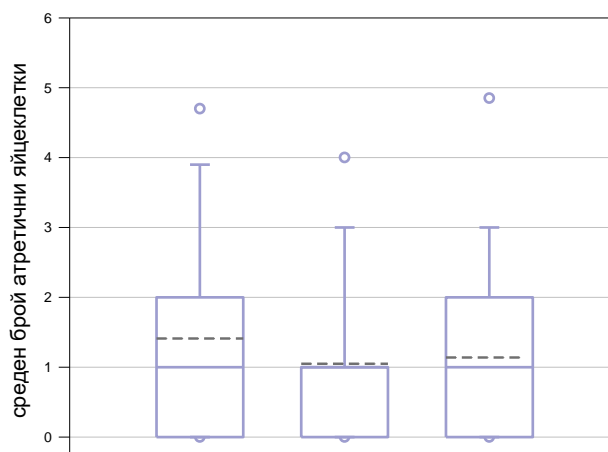


Фиг. 27. Сравнение между групите според стойността на E2 по средния брой добити яйцеклетки

Изследването на зависимостта между стойностите на E2 и на средния брой на атретичните яйцеклетки и делът им от общия брой (Табл. 27 и 28), не се установиха статистически значими различия в изследваните групи ( $H = 1.98$ ,  $p = 0.371$ ) и респективно ( $H = 0.024$ ,  $p = 0.988$ ) (Фиг. 28 и 29).

Табл. 27. Основни статистически показатели на броя атретични яйцеклетки при групите според стойността на E2

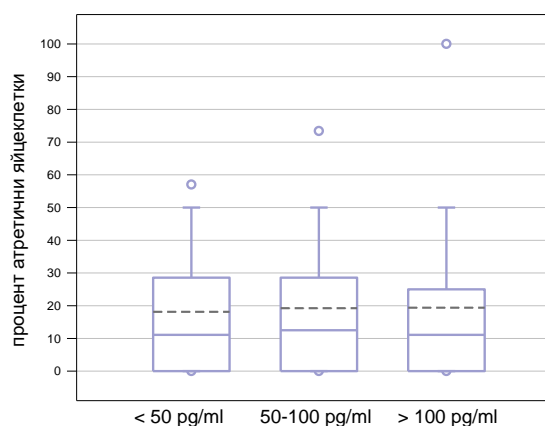
E2	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
под 50 pg/ml	216	0	14	1.4	0.14	2.1	1.0
от 50 до 100 pg/ml	259	0	8	1.1	0.08	1.4	1.0
над 100 pg/ml	93	0	6	1.1	0.14	1.4	1.0



Фиг. 28. Сравнение между групите според стойността на E2 по броя атретични яйцеклетки

Табл. 28. Основни статистически показатели на процента атретични яйцеклетки при групите според стойността на E2

E2	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
под 50 pg/ml	216	0	100	18.1	1.55	22.8	11.1
от 50 до 100 pg/ml	259	0	100	19.3	1.55	24.9	12.5
над 100 pg/ml	93	0	100	19.4	2.72	26.2	11.1



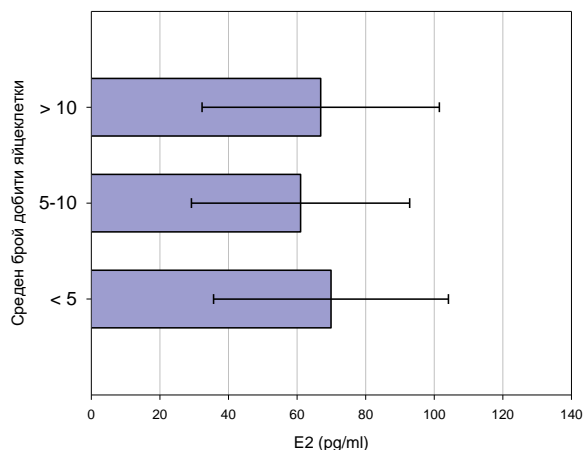
Фиг. 29. Сравнение между групите според стойността на E2 по дела атретични яйцеклетки

Данните за намаляване на отговора на КОХ с нарастване нивата на E2 се затвърждават и от анализа на средните стойности на хормона при жените с различен тип отговор на КОХ (Табл. 29), като се установява статистически значима разлика в средните стойности на хормона между пациентките със слаб и задоволителен отговор с тенденция на подобряване на яйчниковия отговор с намаляване на базалните нива на хормона (Фиг. 30) ( $H = 9.3$ ,  $p = 0.01$ ).



Табл. 29. Основни статистически показатели на стойността на E2 при пациентки с различен отговор на стимулация

	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
< 5	218	5.3	148.5	69.9	2.32	34.2	61.0
5 - 10	250	5.0	150.0	61.0	2.01	31.8	55.1
> 10	109	19.0	149.6	66.9	3.31	34.6	55.0

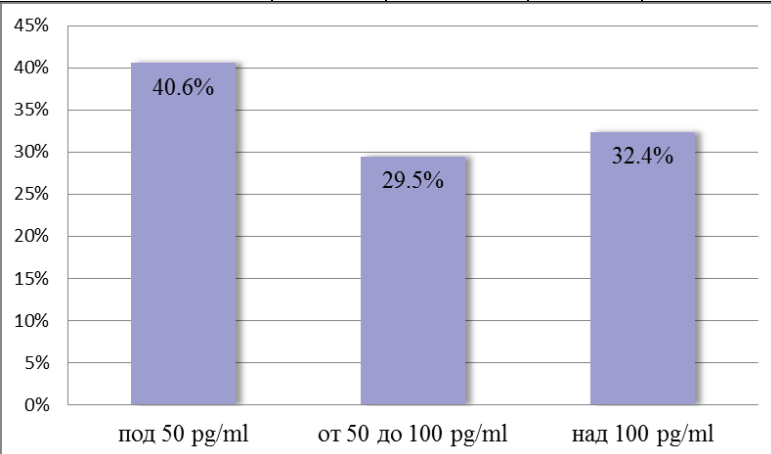


Фиг. 30. Сравнение на стойностите на E2 при пациентки с различен отговор на стимулация

Серумните нива на E2 не се оказват надежден маркер за изхода от АРТ, тъй като не се отчита достоверна разлика в постигнатите клинични бременности в изследваните групи ( $\chi^2 = 5.12$ ,  $p = 0.077$ ) (Табл. 30 и Фиг. 31).

Табл. 30. Честота на бременностите (в брой и процент) при групите според стойността на E2

E2	бременности			
	да		не	
	брой	%	брой	%
под 50 pg/ml	71	40.6%	104	59.4%
от 50 до 100 pg/ml	56	29.5%	134	70.5%
над 100 pg/ml	22	32.4%	46	67.6%



Фиг. 31. Процент бременности при групите според стойността на E2

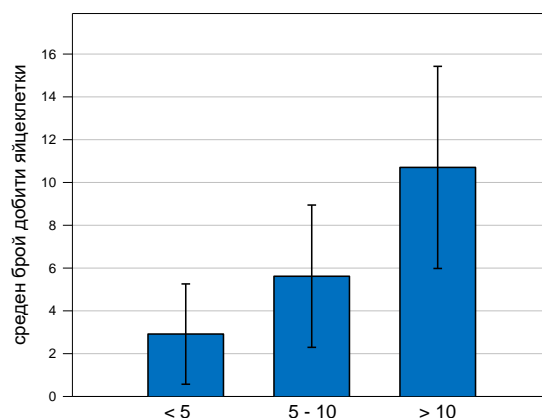
#### IV. 1.7. Брой антрални фоликули.

Определянето на броя на антралните фоликули е лесно и достъпно – може да се извърши при рутинен ултразвуков преглед в ранната фоликуларна фаза, като се отчита броят им общо в двата яйчника. Недостатъкът на този маркер е субективността. При изследването на зависимостта между БАФ и ЯР и изхода от АРТ бяха обхванати 1925 жени, разпределени в три групи по изследвания показател: под 5 антрални фоликула, между 5 и 10 антрални фоликула и над 10 антрални фоликула.

По отношение на връзката между яйчниковия отговор на КОХ и БАФ (Фиг. 32), анализът на данните очаквано показва подчертана правопрпорционална зависимост със статистически достоверни различия при трите типа отговор на КОХ ( $H = 762.9$ ,  $p < 0.0001$ ) (Табл. 31).

Табл. 31. Основни статистически показатели на СБЯ при групите според стойността на БАФ

БАФ	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
под 5	329	0	15	2.9	0.13	2.3	2.0
от 5 до 10	1012	0	20	5.6	0.10	3.3	5.0
над 10	584	1	30	10.7	0.20	4.7	10.0

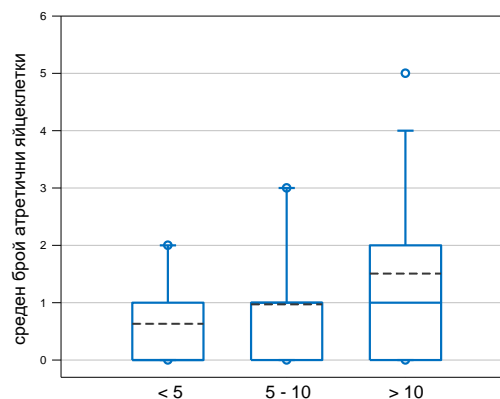


Фиг. 32. Сравнение между групите според стойността на БАФ по СБЯ

Реципрочно на нарастването на средния брой на добитите яйцеклетки, с нарастването на БАФ расте и броят на добитите атретични яйцеклетки (Табл. 32), със статистически достоверни различия между групите ( $H = 59.7$ ,  $p < 0.0001$ ) (Фиг. 33).

Табл. 32. Основни статистически показатели на броя атретични яйцеклетки при групите според стойността на БАФ

БАФ	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
под 5	307	0	7	0.6	0.05	0.9	0.0
от 5 до 10	994	0	14	1.0	0.04	1.4	1.0
над 10	584	0	14	1.5	0.08	1.9	1.0

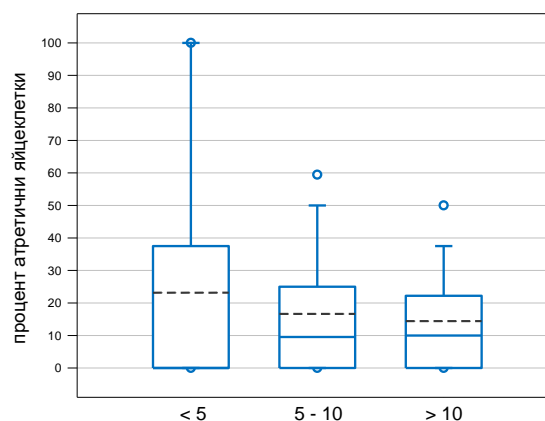


Фиг. 33. Сравнение между групите според стойността на БАФ по броя атретични яйцеклетки

Средният дял на атретичните яйцеклетки в групите, обаче, остава постоянен (Табл. 33) – без сигнификантна разлика в групите с различен БАФ ( $H = 0.39$ ,  $p = 0.828$ ) (Фиг. 34).

Табл. 33. Основни статистически показатели на процента атретични яйцеклетки при групите според стойността на БАФ

БАФ	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
под 5	307	0	100	23.2	1.86	32.6	0.0
от 5 до 10	994	0	100	16.6	0.68	21.5	9.5
над 10	584	0	100	14.4	0.70	16.9	10.0

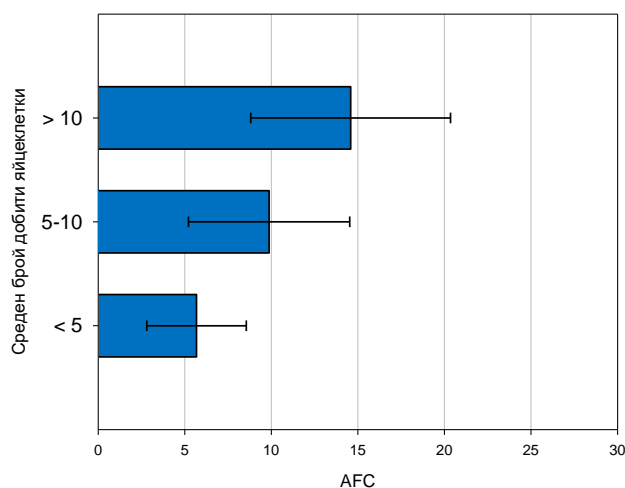


Фиг. 34. Сравнение между групите според стойността на БАФ по процента атретични яйцеклетки

Значима правопрпорционална зависимост очаквано се наблюдава между БАФ и типа яйчников отговор на КОХ ( $H = 802$ ,  $p < 0.0001$ ) (Табл. 34 и Фиг. 35) при използване на метода на Dunn при сравнението на групите – по-големият БАФ предопределят по-добър яйчников отговор на КОХ.

Табл. 34. Основни статистически показатели на стойността на БАФ при пациентки с различен отговор на стимулация

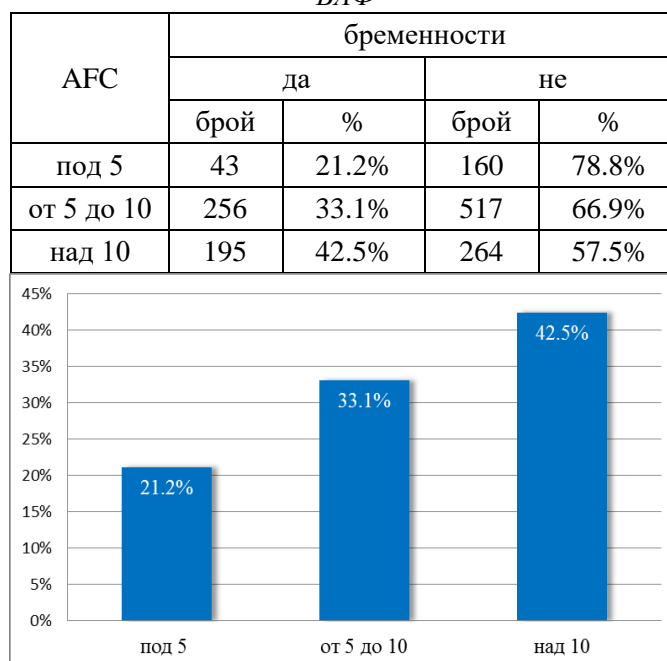
	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
< 5	746	1	30	5.7	0.11	2.9	5
5 - 10	821	1	30	9.9	0.16	4.7	9
> 10	358	2	40	14.6	0.30	5.8	14



Фиг. 35. Сравнение на стойностите на БАФ при пациентки с различен отговор на стимулация

При изследване на изхода от АРТ според БАФ, се установява категорично достоверно различие между групите в процента постигнати бременности (Табл. 35) – по-висок процент на постигнатите клинични бременности при по-голям изходен БАФ (Фиг. 36) ( $p < 0.0001$ ).

Табл. 35. Честота на бременностите (в брой и процент) при групите според стойността на БАФ



Фиг. 36 Процент бременности при групите според стойността на БАФ

От така проведените проучвания и анализи относно прогностичната стойност на маркерите на ЯР по отношение на качествения и количествен потенциал на яйчника и яйчниковия отговор на КОХ, от една страна и изхода от АРТ, от друга, се налага изводът, че различните маркери имат различна сила да прогнозираят отделните аспекти на женската фертилност.

По отношение на **количествения резерв на яйчниковия апарат и СБЯ**, добити при фоликуларна пункция след ККОХ, най-силна и категорична прогностична стойност имат възрастта на жената, БАФ и АМХ, със строго изразена достоверна правопрпорционална зависимост между изследваните параметри във всички изследвани групи. Тази зависимост се потвърждава както при изследване на СБЯ при различни стойности на маркерите, така и при изследване на стойностите на маркерите при различните типове отговор на КОХ. Тези данни потвърждават проучвания, които установяват най-висока чувствителност и специфичност по отношение прогнозата за яйчниковия отговор на стимулация за БАФ и АМХ (219, 220, 224). Нашите данни, обаче, са категорични, че към тази група на прогностичните маркери с много голяма тежест трябва да се добави възрастта на жената.

ФСХ, съотношението FSH/LH, Инхибин Б и Е2 също имат прогностична стойност в количествен аспект, но тенденцията не е така подчертана и губи информативността и достоверността си в някои от изследваните групи. При ФСХ добър яйчников отговор е налице при сравнително ниски нива на хормона – до 8.5IU/l, над които вариациите в стойностите му не са достоверни и информативни за отговора на КОХ. Тези резултати не подкрепят проучвания, които залагат като горно гранични стойности на хормона до 25 UI/l (218). Съотношението FSH/LH има информативност само в крайните групи – под 1 и над 2, т.е. при много ниски или много високи стойности. Е2 предполага добър отговор на КОХ само при нива под 50 pg/ml, като отново липсва сигурна предиктивност по

отношение на яйчниковия отговор при по-високи нива на хормона. Получените резултати подкрепят тезата, че повишените нива на E2 се свързват със СЯО (226).

Редица проучвания сочат, че оценката на количествения и качествения резерв на яйчника едновременно, е трудно, доколкото трансформацията на примордиалните фоликули в антрални отнема месеци, в които кохортата на антралните фоликули и гаметите в тях търпят развитие (222). В противовес на тези данни, обаче, нашите резултати по отношение на **броя на атретичните яйцеклетки**, добити след КОХ и делът им от общия брой добити яйцеклетки установява, че предиктивна стойност по отношение на абсолютния им брой имат отново маркерите с подчертана сила за прогнозиране на количествения капацитет на яйчника – възраст, БАФ, АМХ. Абсолютният брой на добитите атретични яйцеклетки следва тенденцията на общия брой на добитите яйцеклетки – нараства с нарастването на СБЯ.

Що се касае до **делът на атретичните яйцеклетки** в различните изследвани групи, обаче, той се запазва достоверно идентичен – между 14% и 23%, без сигнификантна разлика между групите. Това налага изводът, че независимо от яйчниковия отговор на стимулация, делът на атретичните яйцеклетки, които не подлежат на оплождане и се губят за процедурата, от общия брой добити яйцеклетки, е еднакъв в различните групи с различен отговор на стимулация. Този феномен е с негативно отражение главно върху жените със СЯО. При тях, поради малкия оставащ брой яйцеклетки, които могат да бъдат подложени на оплождане, селекцията на ембриони е силно компрометирана и често невъзможна и това е свързано с намален шанс за бременност.

Най-важният резултат – изходът от АРТ, измерен в **процент на постигнатите клинични бременности**, е най-трудно да бъде предвиден с изследваните маркери на яйчниковия резерв. Това е очаквано, тъй като настъпването на бременност зависи от много и различни фактори, а не само от яйчниковия резерв. Направените анализи все пак показват твърда обвързаност на процента клинични бременности с отговора на КОХ и прогностична сила по отношение на процента бременности от страна на маркерите, които в най-голяма степен прогнозираят и отговора на КОХ, а именно възрастта на жената и БАФ. Макар и с изразена тенденция, но без статистическа достоверност, се наблюдава нарастване на процента клинични бременности с нарастване на стойностите на АМХ. ФСХ има значима предиктивна стойност за по-добър изход от АРТ само при стойности под 8.5IU/L, като над тези стойности хормонът има противоречива информативност. Останалите изследвани маркери – Инхибин Б, съотношение FSH/LH, E2, нямат статистически достоверна предиктивна сила по отношение на постигнатите бременности.

Дори и при пациентите със **СЯО**, силата на възрастта да предопределя до голяма степен изхода от АРТ, се запазва. В литературата няма единно становище относно обвързаността на изхода от АРТ с възрастта при пациентки със СЯО. Голяма част от проучванията поддържат тезата, че изходът при пациенти с НЯР, е еднакво неблагоприятен, независимо от възрастта, поради паралелни процеси на яйчничково остаряване, които засягат не само броя на антралните фоликули, но и качеството на яйцеклетките. Тези автори говорят за „яйчникова възраст“, независимо от хронологичната (59-62). Има и проучвания, които поддържат обратната хипотеза, а именно, че шансът за бременност при младите жени със СЯО е много по-голям, поради

по-доброто качество на макар и малкото добити яйцеклетки (74-76). Нашите резултати потвърждават именно тези данни и доказват, че младите жени с НЯР и СЯО на КОХ имат достоверно по-големи шансове за бременност в сравнение с тези в напреднала репродуктивна възраст. Това предполага предлагане на различен тип консултация и прогноза при пациентите със СЯО според възрастта.

Прилагането на статистическия метод за изчисление на Коефициента на корелация на Spearman позволява да се сравни **силата на прогностичната стойност** на всеки от изследваните маркери по отношение на броя и качеството на добитите яйцеклетки (Табл. 36). Стойностите с положителен знак означават положителна корелация между изследваните показатели, т.е. нарастване на броя на яйцеклетките с увеличаване стойностите на маркера, а тези с отрицателен знак съответно показват отрицателна корелация между тях. Колкото по близък до единица е коефициентът на корелация, толкова по-силна е корелацията между изследваните показатели. Достоверността на коефициента на корелация зависи от стойността на Р. С една \* са отбелязани достоверните коефициенти с обичайното ниво на значимост 0.05, а с две \*\* - тези с по-строго ниво 0.01.

Табл. 36. Стойности на коефициента на корелация прогностичните маркери за ЯР.

	СБЯ	СБАЯ	АЯ%
възраст	-,429**	-,141**	-.021
ФСХ	-,355**	-.059	.048
FSH/LH	-,321**	-.068	.018
E2	-,098*	-.030	.016
АМХ	,594**	,193**	-.001
БАФ	,688**	,187**	-.007
Инх. Б	,217*	-.054	-.096

На базата на получените резултати и направения анализ може да се заключи, че с най-добра предиктивна стойност по отношение на ЯР са възрастта на жената, БАФ и АМХ. АМХ има недостатъка, че няма прогностичност по отношение на процента бременности, за разлика от другите два маркера.

Бихме могли схематично да степенуваме значимостта на маркерите за ЯР по следния начин:

$$\text{Възраст} = \text{БАФ} \geq \text{АМХ} > \text{ФСХ} = \text{FSH/LH} = \text{Инхибин Б} > \text{Е2}$$

## IV. 2. Анализ на влиянието на фактори, произтичащи от начина на живот като индекс на телесната маса и тютюнопушене върху ЯР и изхода от АРТ.

### IV.2.1. ИТМ.

Негативното влияние на отклоненията в ИТМ върху фертилния потенциал на жената е обект на дългогодишни проучвания (90 – 100). За оценка на зависимостта между ИТМ и ЯР и изхода от АРТ, жените са разделени на 4 групи по ИТМ, съобразно критериите на СЗО. Основният дял от лекуваните за стерилитет жени са с оптимално тегло – 699 (57,7%), не малък е дялът, почти една четвърт, на жените с наднормено тегло – 284 (23,5%), а жените със субоптимално тегло и затлъстяване са около една пета от всички, а именно 116 (9,6%) и 112 (9,2%). Достоверно по-ниска е средната възраст само в групата на жените с много ниско тегло – 34 г. спрямо останалите групи със средна възраст – 35,5 г., 37 г. и 38 г., т.е. възрастта не е фактор, който допълнително повлиява резултатите в тази задача.

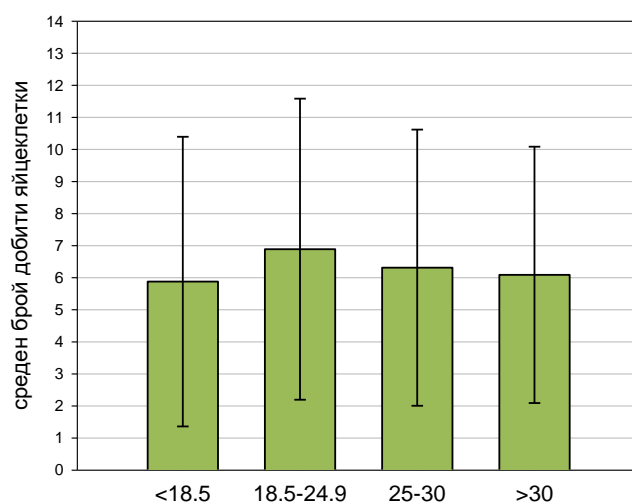
За оценка на влиянието на ИТМ върху ЯР отново е отчетен СБЯ добити след КОХ в групите, дялът на атретичните яйцеклетки и процентът на клиничните бременности.

Резултатите от теста на Kruskal-Wallis сочат достоверно значими различия в СБЯ, добити след КОХ ( $H = 8.33$ ;  $p = 0.040$ ) в четирите групи (Табл. 37).

Табл.37 Основни статистически показатели на средния брой добити яйцеклетки при групите според ИТМ

ИТМ	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
<18.5	116	0	20	5.9	0.42	4.5	5
18.5-24.9	699	0	27	6.9	0.18	4.7	6
25-30	284	0	22	6.3	0.26	4.3	5
>30	112	0	20	6.1	0.38	4.0	5

Налице са статистически достоверни негативни тенденции както при много ниско тегло, така и при наднормено тегло и особено при затлъстяване (Фиг. 37).

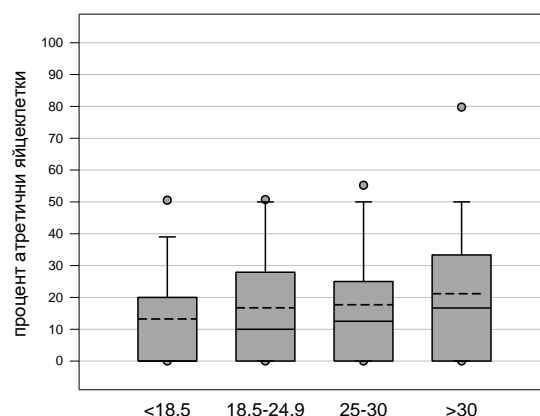


Фиг. 37. Сравнение между групите според ИТМ по средния брой добити яйцеклетки

Достоверни различия има и в дела на добитите атретични яйцеклетки в различните групи ( $H = 11.4$ ;  $p = 0.010$ ), като делът им нараства с нарастване на стойностите на ИТМ (Табл. 38, Фиг. 38).

Табл. 38. Основни статистически показатели на процента атретични яйцеклетки при групите според ИТМ

ИТМ	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
<18.5	109	0	100	13.2	2.16	22.5	0
18.5-24.9	688	0	100	16.7	0.83	21.8	10.0
25-30	277	0	100	17.7	1.31	21.8	12.5
>30	111	0	100	21.2	2.37	24.9	16.7

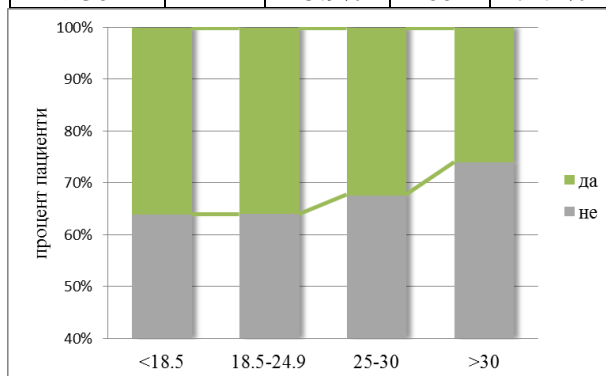


Фиг. 38. Сравнение между групите според ИТМ по процента атретични яйцеклетки

Въпреки, че по отношение на постигнатите бременности не се наблюдава статистически значима разлика в изследваните групи ( $\chi^2 = 3.61$ ;  $p = 0.307$ ), тенденцията на обратна корелационна зависимост между ИТМ и клинични бременности е ясна (Табл. 39, Фиг. 39).

Табл. 39. Честота на бременностите (в брой и процент) при групите според ИТМ

ИТМ	бременности			
	да		не	
	брой	%	брой	%
<18.5	27	36.0%	48	64.0%
18.5-24.9	193	35.9%	345	64.1%
25-30	72	32.3%	151	67.7%
>30	21	25.9%	60	74.1%



Фиг. 39. Сравнение между групите според ИТМ по процент бременности



Представените резултати сочат, че показателите, свързани с качествения потенциал на яйчника - делът на атретичните яйцеклетки и процентът бременности, бележат ясна негативна тенденция с нарастването на ИТМ.

#### IV.2.2. Тютюнопушене.

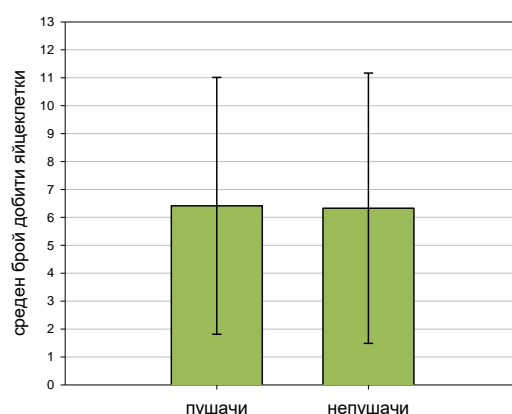
Вредните навици неминуемо повлияват фертилния потенциал на жената. Редица проучвания анализират ефекта от тютюнопушенето върху фертилността при жените и всички поддържат схващането, че тютюнопушенето има негативен ефект (77, 78).

Изследването на ефекта на тютюнопушенето върху ЯР обхваща 733 жени – 441 пушещи (60,2%) и не пушещи 292 (39,8%), без статистически достоверна разлика в средната възраст, която е съответно 36 г. и 35 г. Изследвани са отново СБЯ, добити след КОХ в двете групи, делът на атретичните яйцеклетки и процентът на клиничните бременности.

По отношение на връзката между тютюнопушенето и СБЯ, добити след КОХ, не се установява достоверна разлика с теста на Mann-Whitney ( $U = 62704$ ;  $p = 0.548$ ) (Табл. 40, Фиг. 40).

Табл. 40. Основни статистически показатели на СБЯ при групите пушачи/непушачи

тютюно- пушене	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
пушачи	441	0	27	6.4	0.22	4.6	5
непушачи	292	0	30	6.3	0.28	4.8	5

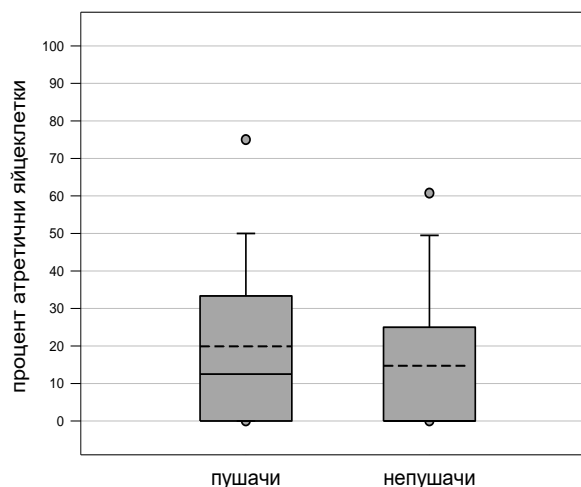


Фиг. 40. Сравнение между групите пушачи/непушачи по СБЯ

Данните по отношение на негативния ефект на тютюнопушенето върху качеството на яйцеклетките са убедителни и закономерни – установява се статистически сигнификантно по-голям процент на атретичните яйцеклетки в групата на пушещите ( $U = 54\,342$ ;  $p = 0.005$ ) (Табл. 41, Фиг. 41).

Табл. 41. Основни статистически показатели на процента атретични яйцеклетки при групите пушачи/непушачи

тютюно-пушене	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
пушачи	431	0	100	19.9	1.22	25.3	12.5
непушачи	286	0	100	14.7	1.28	21.7	0



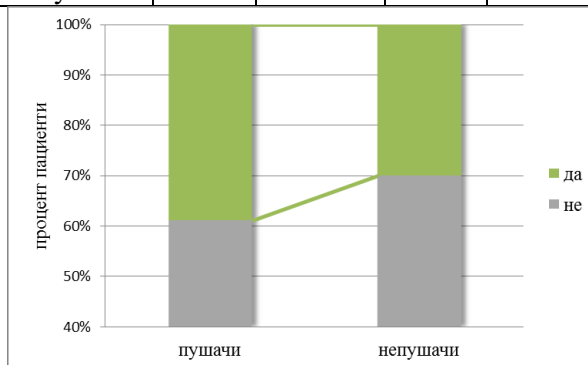
Фиг. 41. Сравнение между групите пушачи/непушачи по процента атретични яйцеклетки

Допълнително потвърждение на негативния ефект на вредния навик върху качеството на добитите яйцеклетки се получава от изследването на разпределението на пушещите и не пушещите жени в групата на пациентките с добити изцяло атретични яйцеклетки – 73,9% пушещи и 26,1% не пушещи, със статистически достоверна разлика между тях ( $\chi^2 = 5.26$ ;  $p = 0.022$ ).

По отношение на процента на постигнатите клинични бременности се установява статистически по-висок процент бременности в групата на пушещите жени ( $\chi^2 = 4.22$ ;  $p = 0.040$ ) – 134/345 (38,8%) срещу 65/217 (30%) (Табл. 42, Фиг. 42) – резултат, вероятно повлиян от други фактори, имащи отношение към настъпването на бременност като ЯР, тежест на мъжкия фактор, условия за имплантация, ендометриоза и др. Този резултат потвърждава и проучванията, които отчитат, че яйчниковият отговор на FSH стимулация и процента бременности, са нормални при пушачки с нормален яйчников резерв (87).

Табл. 42. Честота на бременностите (в брой и процент) при групите пушачи/непушачи

тютюно-пушене	бременности			
	да		не	
	брой	%	брой	%
пушачи	134	38.8%	211	61.2%
непушачи	65	30.0%	152	70.0%



Фиг. 42. Сравнение между групите пушачи/непушачи по процент бременности

#### IV. 3. Анализ на влиянието на прекарани възпалителни заболявания и оперативни интервенции в малкия таз върху ЯР и изхода от АРТ.

##### IV.3.1. Възпалителни процеси и ЯР.

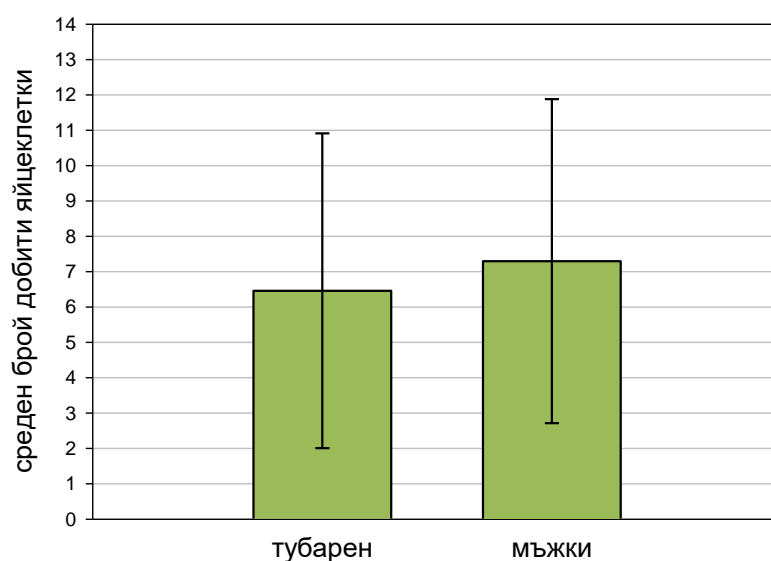
Прекараните възпалителни процеси в малкия таз са водеща причина за стерилитет по различни механизми – най - често чрез засягане на маточните тръби и компрометиране на тяхната проходимост, засягане на фоликуларния апарат на яйчника от възпалителни процеси с пряко отражение върху отговора на стимулация като брой и качество на добитите яйцеклетки, риск от не пълно ирадициране на възпалителния процес и поддържане на среда на хронично възпаление в малкия таз, която неминуемо компрометира условията за имплантация и правилно развитие на бременността (136, 137, 344, 345).

За да изследваме влиянието на прекараните възпалителни процеси в малкия таз върху ЯР и изхода от АРТ, сме сравнили СБЯ, делът на атретичните яйцеклетки от общия брой добити и процента на клиничните бременности при жени с тубарен и мъжки фактор, като причина за стерилитет. Изследвани са общо 1349 пациентки, от които 570 (42,3%) са с тубарен фактор и 779 (57,7%) са с мъжки фактор.

По отношение на яйчниковия отговор на КОХ тестът на Mann-Whitney установи достоверни различия в средния брой на добитите яйцеклетки при жените с тубарен и мъжки фактор ( $U = 197\ 518$ ;  $p < 0.0001$ ), като се отчита по-малък СБЯ при жените с тубарен (Табл. 43, Фиг. 43).

Табл. 43. Основни статистически показатели на средния брой добити яйцеклетки при групите с „тубарен фактор“ и „мъжки фактор“

вид стерилитет	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
тубарен	570	0	25	6.5	0.19	4.5	6
мъжки	779	0	26	7.3	0.16	4.6	6

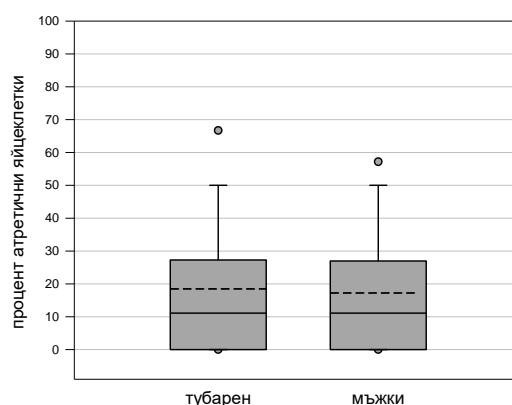


Фиг. 43. Сравнение между групите „тубарен фактор“ и „мъжки фактор“ по средния брой добити яйцеклетки

Делът на атретичните яйцеклетки е сравним в двете групи (Табл. 44, Фиг. 44) ( $U = 209\,825$ ;  $p = 0.663$ ), с леко изразена тенденция на завишение на процента на атретичните яйцеклетки в групата на жените с тубарен фактор спрямо този при жените с мъжки стерилитет.

Табл. 44. Основни статистически показатели на процента атретични яйцеклетки при групите с „тубарен фактор“ и „мъжки фактор“

вид стерилитет	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
тубарен	551	0	100	18.5	0.99	23.3	11.1
мъжки	772	0	100	17.3	0.77	21.5	11.1

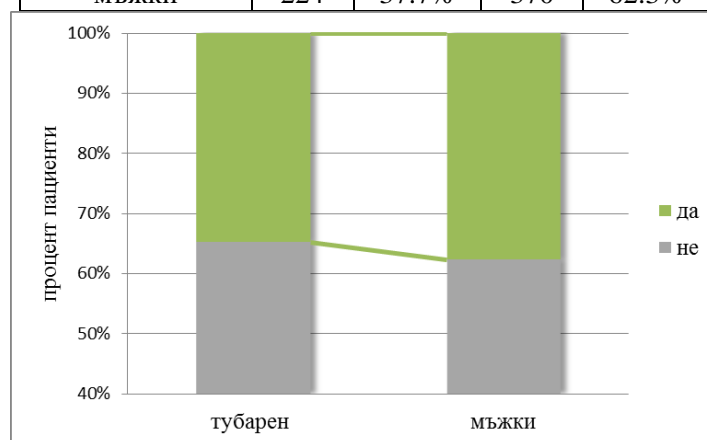


Фиг. 44. Сравнение между групите по процента атретични яйцеклетки

По отношение на постигнатите бременности не се отчита сигнификантна разлика в двете групи ( $\chi^2 = 0.83$ ;  $p = 0.362$ ), но тенденцията на по-малко бременности при жените с тубарен фактор се запазва, а именно 149/429 (34,7%) спрямо 22/594 (37,7%) при мъжкия фактор (Табл. 45, Фиг. 45).

Табл. 45. Честота на бременностите (в брой и процент) при групите с „тубарен фактор“ и „мъжки фактор“

вид стерилитет	бременности			
	да		не	
	брой	%	брой	%
тубарен	149	34.7%	280	65.3%
мъжки	224	37.7%	370	62.3%



Фиг. 45. Сравнение между групите „тубарен фактор“ и „мъжки фактор“ по процент бременности

Сравнението на стойностите на всеки от маркерите за ЯР в двете групи показва тенденция на влошаване на показателите при жените с данни за прекаран възпалителен процес, без да се установяват достоверни различия, с изключение на БАФ. При БАФ различията между сравняваните групи са достоверни ( $U = 172\ 867$ ;  $p < 0.001$ ), което отново доказва предиктивната му значимост.

#### IV. 3. 2. Оперативни интервенции и ЯР.

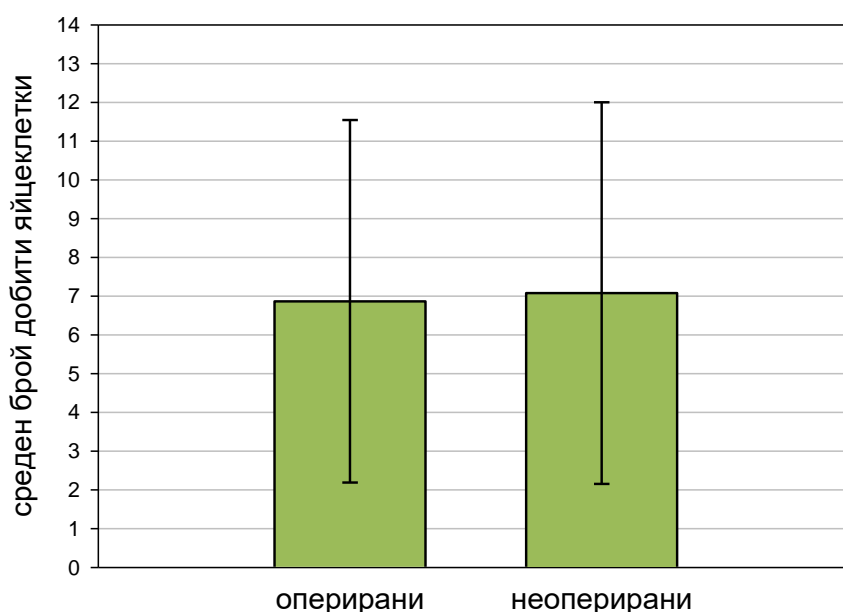
Почти всяка оперативна интервенция в малкия таз е потенциална заплаха за яйчниковия резерв поради риск от засягане на здрава яйчникова тъкан, намаляване на кръвотока на яйчника и/или последваща възпалителна реакция (114, 115, 353).

За да се изследва ефекта на преминалите оперативни интервенции в коремната кухина върху ЯР и изхода от IVF/ICSI процедурите, сме изследвали 1226 жени, които сме разделили на две групи според това претърпели ли са или не коремни операции, независимо ендоскопски или с отворен достъп и са отчетени СБЯ, процент на атретичните яйцеклетки и клинични бременности. Разпределението им е почти равномерно – 581 оперирани (47,4%) и 645 не оперирани (52,6%), като средната възраст в двете групи е респ. 36 г. и 35 г., без достоверна разлика по отношение на възрастта.

Средният брой на добитите след КОХ яйцеклетки в двете групи е без статистически достоверна разлика ( $U=183\ 704$ ;  $p=0.552$ ), с лека положителна тенденция при не оперираните жени (Табл. 45, Фиг. 45).

Табл. 45. Основни статистически показатели на средния брой добити яйцеклетки при групите оперирани/не оперирани

операции	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
оперирани	581	0	27	6.9	0.19	4.7	6
неоперирани	645	0	30	7.1	0.19	4.9	6

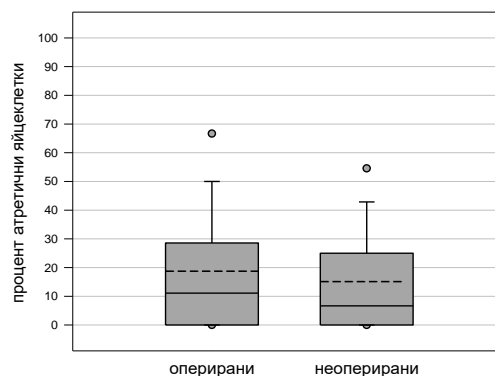


Фиг. 45. Сравнение между групите оперирани/неоперирани по средния брой добити яйцеклетки

Делът на атретичните яйцеклетки е сигнификантно по-голям в групата на оперираните жени ( $U=165815$ ;  $p=0.012$ ) – 18,7% атретични яйцеклетки при оперираните жени и 15,1% при не оперираните (Табл. 46, Фиг. 46).

Табл. 46. Основни статистически показатели на процента атретични яйцеклетки при групите оперирани/неоперирани

операции	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
оперирани	572	0	100	18.7	1.01	24.0	11.1
неоперирани	630	0	100	15.1	0.84	21.1	6.7

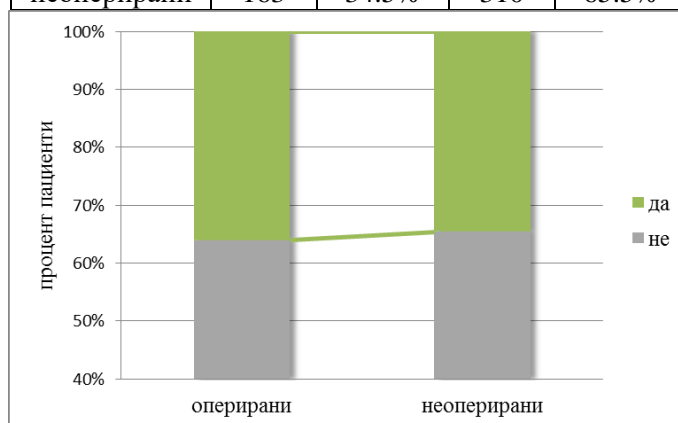


Фиг. 46. Сравнение между групите оперирани/неоперирани по процента атретични яйцеклетки

При еднаква средна възраст в двете изследвани групи, не се отчита статистически достоверна разлика в процента на постигнатите клинични бременности ( $p = 0.538$ ) – 156/434 (35,9%) при оперираните жени и 163/473 (34,5%) при не оперираните (Табл. 47, Фиг. 47). Вероятно тези резултати се дължат на факта, че СБЯ и в двете групи е сравним и задоволителен – над 5 добити яйцеклетки и средната възраст не е висока.

Табл. 47. Честота на бременностите (в брой и процент) при групите оперирани/неоперирани

операции в малкия таз	бременности			
	да		не	
	брой	%	брой	%
оперирани	156	35.9%	278	64.1%
неоперирани	163	34.5%	310	65.5%



Фиг. 47. Сравнение между групите оперирани/неоперирани по процент бременности

От маркерите на ЯР тестът на Mann-Whitney отчита най-чувствително и статистически достоверно отклонение в БАФ ( $U = 167\,604$ ;  $p = 0.009$ ), който очаквано е занижен при оперираните пациенти – 8,8 ( $SD \pm 0,2$ ) в сравнение с не оперираните – 9,6 ( $SD \pm 0,2$ ).

Златен стандарт в оперативното лечение на хидросалпингса е оперативното отстраняване на маточната тръба – салпингектомия. Поради анатомична връзка между кръвоснабдяването на маточната тръба и яйчника и риск от засягането на кръвоснабдяването към фоликуларния пул и респ. намаляване на ЯР при такава операция, усилията на нашия екип са насочени към максимално щадящи по отношение на яйчниковото кръвоснабдяване подходи при оперативното лечение на хидросалпингс. Алтернатива на класическата салпингектомия е електрокоагулацията на маточните тръби (ЕКМТ) в истмичната им част, за механично изолиране на течността, задържана в запушената маточната тръба и съдържащите се в нея токсини и фактори на възпалението от маточната кухина, където ще се трансферират ембрионите при АРТ.

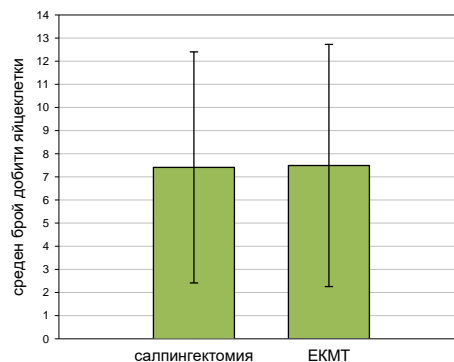
В настоящото проучване е сравнен ефектът на двата вида оперативни процедури върху показателите на ЯР – СБЯ, дял на атретичните яйцеклетки и процент бременности. Изследвани са 98 (85,2%) жени преминали салпингектомия и 17 (14,8%) жени претърпели ЕКМТ.

По нито един от изследваните показатели не се отчита достоверно различие при прилагането на двата вида операции, като тенденциите са в посока на салпингектомията.

Средният брой на добитите яйцеклетки при двата вида операции е без достоверни различия ( $U = 763$ ;  $p = 0.583$ ) (Табл. 48, Фиг. 48).

Табл. 48. Основни статистически показатели на СБЯ пациентките със салпингектомия и ЕКМТ

вид операция	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
салпингектомия	98	0	22	7.4	0.51	5.0	7
ЕКМТ	17	3	27	7.0	1.34	5.5	7.0

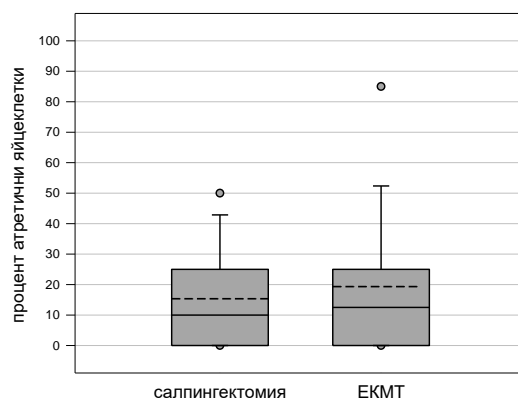


Фиг. 48. Сравнение между пациентките със салпингектомия и ЕКМТ по СБЯ

Няма статистически достоверни различия и по отношение на процента на добитите атретични яйцеклетки от общия брой добити ( $U=746$ ;  $p=0.604$ ) (Табл. 49, Фиг. 49).

Табл. 49. Основни статистически показатели на процента атретични яйцеклетки при пациентките със салпингектомия и ЕКМТ

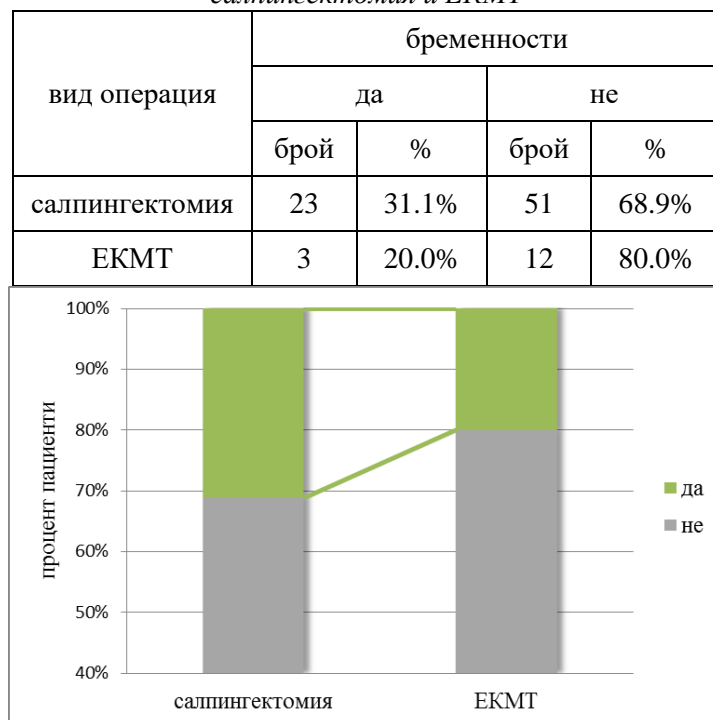
вид операция	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
салпингектомия	98	0	100	15.4	2.07	20.2	10.0
ЕКМТ	17	0	100	19.3	6.41	26.4	12.5



Фиг. 49. Сравнение между пациентките със салпингектомия и ЕКМТ по процента атретични яйцеклетки

Не се отчита сигнификантна разлика и в процента на получените клинични бременности в двете групи – 23/51 (31,1%) при жените със салпингектомия срещу 3/12 (20%) при тези с ЕКМТ (Табл. 50, Фиг. 50).

Табл. 50. Честота на бременностите (в брой и процент) при пациентките със салпингектомия и ЕКМТ



Фиг. 50. Сравнение между пациентките със салпингектомия и ЕКМТ по процент бременности

По отношение на средната възраст на жените в двете групи не се отчита статистически значима разлика ( $t = 1,377, p = 0.171$ ) – средна възраст в групата на жените със салпингектомия 34, 9 г. срещу 36,6 г. при жените с ЕКМТ. Използваният t-test, обаче,



е с малка сила – 0.144, което предполага, че влиянието на възрастта не може да бъде отхвърлено със сигурност и по-младата възраст на жените в групата със салпингектомия да обяснява по-добрите резултати в тази група, макар и без статистическа достоверност. Възможно е и малкият брой на жените в групата с ЕКМТ да е причина за липса на достоверни различия и липса на убедителност на данните.

Негативното влияние на наднорменото тегло върху фертилния потенциал на жената отдавна е добре проучено (94-100). Нашите резултати по отношение изследването на зависимостта между отклоненията в **Индекса на телесната маса** и ЯР доказват негативно отражение на отклоненията в индекса както в посока на наднормено тегло и най-вече при затлъстяване, но включително и при поднормено тегло. СБЯ намалява статистически достоверно и при много ниско и при много високо тегло. Делът на атретичните яйцеклетки е в статистически достоверна правопрпорционална корелационна зависимост от теглото, вероятно поради негативния ефект на по-високите концентрации на серумните нива на естрогените с увеличаването на подкожната мастна тъкан. Пряко следствие на намаляването на броя на добитите яйцеклетки и увеличаването на делът на атретичните сред тях са и постигнатите бременности - макар и статистически недостоверно, се наблюдава тенденция на намаляване на процента бременности с увеличаването на ИТМ. Тези резултати недвусмислено доказват значението на оптималното тегло за състоянието на ЯР в количествен и качествен аспект и респективно изхода от АРТ.

Повечето проучвания поддържат схващането, че намалената фертилност при пушачките е свързана с редуциране на яйчниковия резерв от агентите на тютюневия дим – никотина в кръвта води до периферен съдов спазъм, вкл. и на съдовете на яйчника с пряко засягане на неговата функция (87). Анализът на нашите данни е в различен аспект и сочи, че **тютюнопушенето** компрометира главно качествения ЯР. Докато по отношение на СБЯ не се отчита достоверна разлика в групата на пушещите жени и тези, които не пушат, то по отношение на делът на атретичните яйцеклетки има сигнификантна разлика между двете групи, с чувствително по-голям дял в групата на пушещите жени. Негативният ефект на тютюнопушенето върху качествения резерв на яйчника се потвърждава и от данните за разпределението на пушещите жени в групата с добити изцяло дегенеративни яйцеклетки – три четвърти от жените в тази група са пушещи. По отношение на постигнатите бременности прави впечатление сигнификантно по-висок процент бременности в групата на жените, които пушат, което съответства на публикувани данни, че при запазване на количествения ЯР, тютюнопушенето не намалява процента бременности (88). При жените с НЯР, обаче, увеличаването на делът на атретичните яйцеклетки поради консумацията на цигари, може да се окаже критичен за изхода от АРТ.

Данните от направените анализи доказват негативния ефект на прекараните **възпалителни заболявания** в малкия таз при жените с тубарен стерилитет върху количествения ЯР, с добитите статистически достоверно по-малък СБЯ в сравнение с жените, които нямат данни за прекарани възпалителни процеси. В тази посока са и отчетените негативни тенденции по отношение на делът на атретичните яйцеклетки и процент бременности в групата на жените с тубарен стерилитет. Изследваните маркери на ЯР също отчитат намаление на резерва при жените с тубарен фактор със сигнификантна значимост при БАФ. Негативни тенденции в изхода от АРТ при пациенти с тубарен фактор се докладват и от други автори (344, 345).

Всяка **оперативна интервенция** в коремната кухина нарушава хомеостазата и може да засегне репродуктивния апарат на жената в една или друга степен (112). Анализът на данните относно влиянието на прекараните оперативни интервенции в коремната кухина върху ЯР и изходът от АРТ, показва, макар и не по всички показатели, значим негативен ефект. Всички изследвани маркери на ЯР се изменени в посока на НЯР при оперираните жени, отново със сигнификантна достоверност от страна на маркера БАФ.

СБЯ очаквано е малко по-висок при не оперираните жени, но без достоверна разлика. Сравнимият брой яйцеклетки при оперираните и не оперираните вероятно се дължи на факта, че поради по-лошите изходни стойности на маркерите на ЯР, при оперираните жени са използвани по-високи дози на гонадотропните медикаменти при последващата стимулация.

Засягането на фоликуларния апарат при прекараните операции е главно в качествен аспект, със статистически достоверно по-голям дял на атретичните яйцеклетки в групата на оперираните пациенти.

Независимо, че нашите данни сочат преди всичко засягане на ЯР в качествен аспект, а литературните данни отчитат предимно количествени промени в БАФ и СБЯ след КОХ (117-119, 130), общата констатация е за редуциране на ЯР след прекарани оперативни интервенции, особено върху яйчниците.

Постигнатите бременности са без достоверни различия в двете групи и следват липсата на достоверна разлика по отношение засягането на количествения ЯР. Задоволителните резултати по отношение на постигнатите бременности при оперираните пациенти в нашето проучване вероятно са за сметка на ограниченото засягане на ЯР и задоволителния отговор на КОХ в тази група, без да се отчита обема на операцията и сравнително ниската средна възраст на жените. Вероятно в по-тясна група на жени с оперативни интервенции насочени главно към яйчниците, бихме установили по-сериозно засягане на ЯР, с критичен ефект върху фертилния потенциал особено при по-възрастните пациентки.

Горните данни предполагат, че необходимостта и обема на оперативните интервенции трябва да се съобразява с изходния ЯР на жената и да се подчинят вкл. и на отражението, което биха имали върху него и шансовете за бременност на жената след операцията.

Анализът на данните от сравнението на двете използвани техники за изолиране на негативния ефект на хидросалпингса върху изхода от АРТ не дава убедителни данни за предимство на едната или другата по отношение засягането на ЯР – не се отчитат достоверни различия по никой от изследваните показатели. Възможно е липсата на убедителна разлика да е следствие на малкия брой в групата на жените с ЕКМТ и по-младата възраст в другата група.

**IV. 4. Анализ на зависимостта между вида на стимулацията и дозите на използваните медикаменти за стимулация при ККОХ върху яйчниковия отговор и изхода от АРТ.**

**IV. 4. 1. Зависимост между вида на стимулацията и яйчниковия отговор и изхода от АРТ.**

Първото описание на състоянието слаб яйчников отговор е отпреди почти три десетилетия (9). През следващите десетилетия са публикувани хиляди проучвания, търсещи подхода и стимулационния протокол, който ще доведе до най-добрия яйчников отговор, възможен при конкретния пациент (10 – 15, 354, 355).

Една от основните цели при лечението на пациенти с методите на АРТ е да се извлече максимумът от яйчниковия потенциал в един цикъл на стимулация, при съобразяване на медицинската безопасност и сигурност на пациента, доколкото успешният изход от ин витро се свързва главно с броя на добитите качествени яйцеклетки.

За да се изследва ефективността на различните видове стимулация върху яйчниковия отговор и изхода от АРТ, е проучен ефектът върху тези параметри на прилагането на три различни вида стимулация – ККОХ, лимитиран цикъл или т.нар. лека стимулация с минимални дози гонадотропини в комбинация или без добавяне на антиестрогени и спонтанен цикъл без прилагане на стимулиращи медикаменти.

Ефектът на дозите на прилаганите гонадотропини върху яйчниковия отговор в количествен и качествен аспект е изследван чрез сравняване на СБЯ и делът на атретичните яйцеклетки при прилагането на различни дози на медикаментите.

За да се изключи влиянието на възрастта, като главен предопределящ изхода от АРТ фактор, изследванията са правени за всяка възрастова група по отделно.

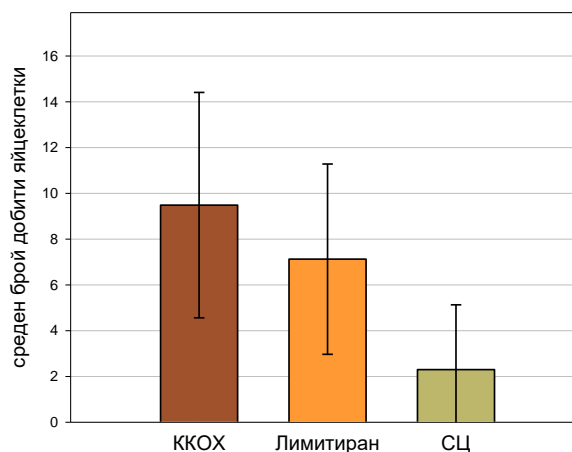
#### **Първа възрастова група ( $\leq 30$ г.)**

Във възрастовата група на най-младите жени са изследвани 484 пациентки. Делът на жените, при които е използван конвенционален подход на стимулация е чувствително по-голям – 81%, лимитиран цикъл е приложен едва при 16,5 %, а спонтанен цикъл само при 2,1%. Големият превес на избора на конвенционална стимулация при младите жени вероятно се дължи именно на стремежа да се постигнат оптимални резултати още при първия ин витро опит и добрите резултати, получени в групата оправдават такъв подход.

Направеният анализ на данните относно СБЯ добити след ККОХ в тази възрастова група сочат статистически достоверни различия в броя на добитите яйцеклетки, при използването на теста на Kruskal Wallis ( $H = 36.1$ ;  $p < 0.001$ ), като техният брой нараства с преминаването към по-агресивен подход (Табл. 51).

Табл. 51. Основни статистически показатели на СБЯ при групите с различен стимуляционен протокол

	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
ККОХ	394	0	30	9.5	0.25	4.9	9.0
Лимитиран	80	0	18	7.1	0.47	4.2	7.0
СЦ	10	0	10	2.3	0.90	2.8	1.5



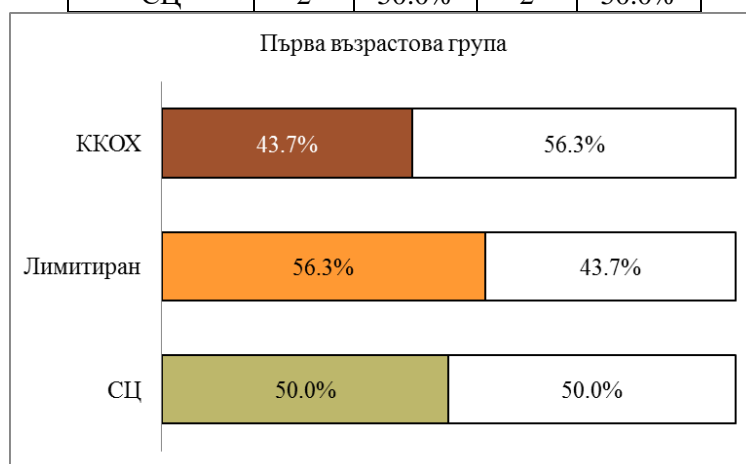
Фиг. 51. Сравнение между групите с различен стимуляционен протокол по СБЯ

На Фиг. 51 много ясно е представена разликата в големия СБЯ при ККОХ, тяхното намаляване при лимитиран цикъл и подчертано малкия им брой (рядко над 1) при пациентите на СЦ.

По отношение на постигнатите бременности не се отчита достоверна разлика между ККОХ и лимитирания цикъл ( $\chi^2 = 3.25$ ;  $p = 0.071$ ). Данните за ефективността на СЦ в тази възрастова група са ненадеждни, поради малкия брой случаи, само 10 (Табл. 52, Фиг. 52).

Табл. 52. Честота на бременностите (в брой и процент) при групите с различен стимуляционен протокол

I възрастова група	бременности			
	да		не	
	брой	%	брой	%
ККОХ	138	43.7%	178	56.3%
лимитиран	40	56.3%	31	43.7%
СЦ	2	50.0%	2	50.0%



Фиг. 52. Сравнение между групите с различен стимуляционен протокол по процент бременности ( $\leq 30$  г.)

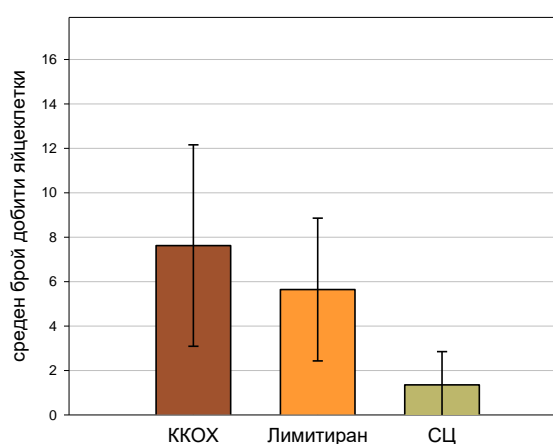
## Втора възрастова група (от 31 до 34 г.)

Втората възрастова група обхваща 563 жени. В тази възрастова група отново се наблюдава предпочитание за използване на ККОХ, като такава е приложена при 84%, при 10,5% е приложен лимитиран цикъл, а при 5,5% - СЦ.

В тази възрастова група отново се наблюдава достоверно различие в СБЯ, при прилагането на различните подходи на стимулацията ( $H = 77.3$ ;  $p < 0.001$ ), като тенденцията се запазва както в предходната група – най-голям брой яйцеклетки при прилагане на ККОХ, по-малък при лимитиран цикъл и най-малък при СЦ (Табл. 53, Фиг. 53).

Табл. 53. Основни статистически показатели на СБЯ при групите с различен стимулационен протокол

	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
ККОХ	473	0	27	7.6	0.21	4.5	7.0
Лимитиран	59	1	14	5.6	0.42	3.2	5.0
СЦ	31	0	7	1.4	0.27	1.5	1.0

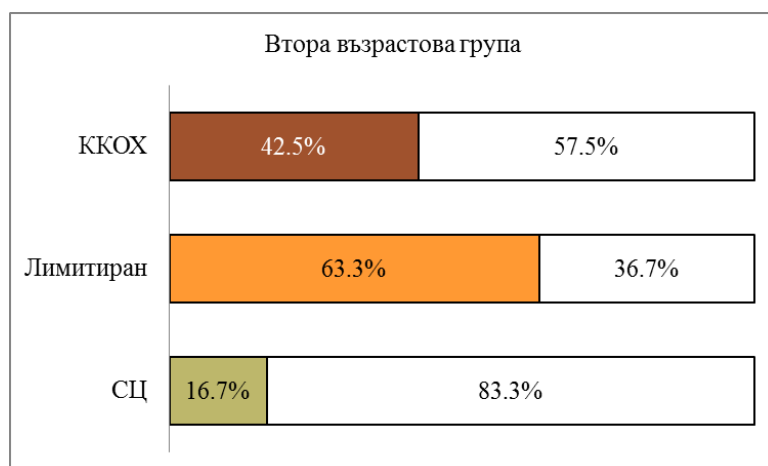


Фиг. 53. Сравнение между групите с различен стимулационен протокол по СБЯ

Анализът на данните по отношение на процента постигнати бременности показва статистически достоверно по-голям процент бременности в групата на жените, при които е проведен лимитиран цикъл ( $\chi^2 = 11.3$ ;  $p = 0.003$ ) в сравнение с другите две групи (Табл. 54, Фиг. 54).

Табл. 54. Честота на бременностите (в брой и процент) при групите с различен стимулационен протокол

II възрастова група	бременности			
	да		не	
	брой	%	брой	%
ККОХ	157	42.5%	212	57.5%
лимитиран	31	63.3%	18	36.7%
СЦ	2	16.7%	10	83.3%



Фиг. 54. Сравнение между групите с различен стимулационен протокол по процент бременности

По-големият процент бременности, постигнати в групата на жените стимулирани с по-лека стимулация или т. нар. лимитарен цикъл, въпреки по-малкия СБЯ, добити след ККОХ, вероятно се дължи на все пак задоволителния СБЯ над 5 и младата възраст на жените в групата, което обуславя все още добро качество и потенциал на яйцеклетките.

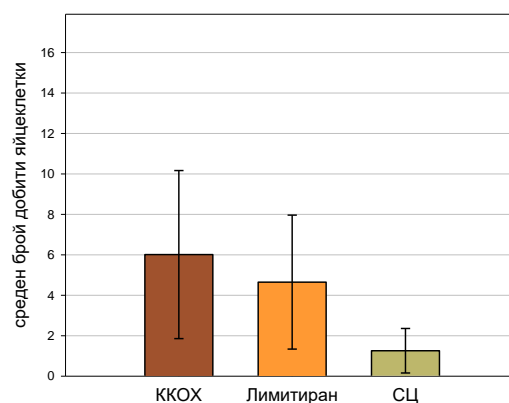
### Трета възрастова група (от 35 до 39 г.)

Третата възрастова група включва 892 жени. В тази възрастова група делът на прилагане на ККОХ остава най-голям – 77,9%, а лимитираният и СЦ са почти по равно, респективно – 11,2% и 10,9%. Прави впечатление тенденцията на нарастване на дела на СЦ, вероятно след СЯО от предшестващ опит.

Анализът на данните по отношение на СБЯ и видът на стимулация показва запазване на тенденцията от предходните възрастови групи с най-голям брой яйцеклетки при пациентките, преминали ККОХ, по-малък при лимитиран цикъл и най-нисък съответно при СЦ, с достоверни различия между групите ( $H = 178.1$ ;  $p < 0.001$ ) (Табл. 55, Фиг. 55).

Табл. 55. Основни статистически показатели на СБЯ при групите с различен стимулационен протокол

	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
ККОХ	695	0	22	6.0	0.16	4.2	5.0
Лимитиран	100	0	17	4.7	0.33	3.3	4.0
СЦ	97	0	6	1.3	0.11	1.3	1.0



Фиг. 55. Сравнение между групите с различен стимулационен протокол по СБЯ

Въпреки значимите различия в броя на добитите яйцеклетки при различен вид стимулация, постигнатите бременности в групите не са достоверно различни ( $\chi^2 = 1.46$ ;  $p = 0.481$ ) (Табл. 56). Тенденцията на намаляване на процента на клиничните бременности от ККОХ към по-леките подходи на стимулация и особено при СЦ, обаче, е ясна (Фиг. 56).

Табл. 56. Честота на бременностите (в брой и процент) при групите с различен стимулационен протокол

III възрастова група	бременности			
	да		не	
	брой	%	брой	%
ККОХ	179	34.7%	337	65.3%
лимитиран	23	30.7%	52	69.3%
СЦ	10	26.3%	28	73.7%

Трета възрастова група

Група	Бременности (да)	Бременности (не)
ККОХ	34.7%	65.3%
Лимитиран	30.7%	69.3%
СЦ	26.3%	73.7%

Фиг. 56. Сравнение между групите с различен стимулационен протокол по процент бременности

Докато при по-младите жени, доброто качество на яйцеклетките осигурява голям шанс за бременност, дори и при по-малък брой овоцити, във възрастовата група 35 – 39 г. вече има ясна тенденция на намаляване на процента бременности с намаляването на СБЯ. Следователно в тази възрастова група вече изборът на стимулационен подход е от важно значение за изхода от АРТ. Добиването на повече яйцеклетки е от изключително значение, доколкото честотата на хромозомни дефекти и особено на анеуплоидии е над 50% (65-70) и повече от половината получени ембриони не са с потенциал да се развият в клинична бременност.

#### Четвърта възрастова група ( $\geq 40$ г.)

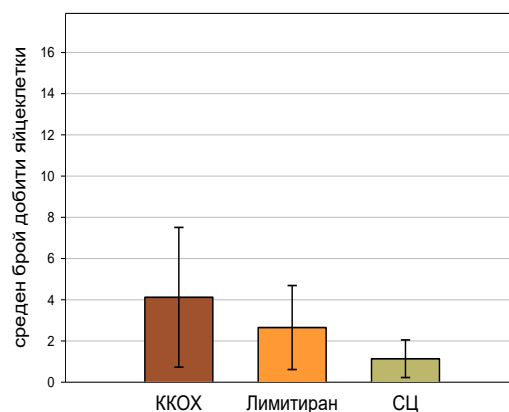
Във възрастовата група на жените над 40 г., която включва 714 жени, преобладава дялът на стимулираните с ККОХ – 60,2%, но чувствително нараства дялът на жените с по-слаба стимулация – лимитиран цикъл 12,9 % и особено на СЦ – 26,9%. Тази тенденция на ръст на използването на по-леки стимулационни подходи се дължи до голяма степен на предшестващи опити, при които въпреки по-агресивната стимулация, също са добити малък брой яйцеклетки.

Запазва се тенденцията на намаляване на СБЯ с намаляване на дозите за стимулация с най-голям СБЯ при жените преминали ККОХ, по-малък при лимитиран цикъл и най-малък респективно при СЦ, с достоверни различия между групите ( $H =$

213.4;  $p < 0.001$ ) (Табл. 57). Независимо от стимулацията, обаче, в разглежданата възрастова група СБЯ е под 5, т.е. налице е СЯО (Фиг. 57).

Табл.57. Основни статистически показатели на СБЯ при групите с различен стимулационен протокол

	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
ККОХ	430	0	24	4.1	0.16	3.4	3.0
Лимитиран	92	0	12	2.7	0.21	2.0	2.0
СЦ	192	0	6	1.1	0.07	0.9	1.0



Фиг. 57. Сравнение между групите с различен стимулационен протокол по СБЯ

Вероятно поради СЯО, независимо от силата на стимулационния подход, се регистрират ниски резултати на постигнатите бременности, сравними в трите изследване групи ( $\chi^2 = 0.205$ ;  $p = 0.975$ ) (Табл. 58).

Табл. 58. Честота на бременностите (в брой и процент) при групите с различен стимулационен протокол

IV възрастова група	бременности			
	да		не	
	брой	%	брой	%
ККОХ	42	14.9%	239	85.1%
лимитиран	7	14.0%	43	86.0%
СЦ	9	15.5%	49	84.5%

Четвърта възрастова група	
ККОХ	14.9% 85.1%
Лимитиран	14.0% 86.0%
СЦ	15.5% 84.5%

Фиг. 58. Сравнение между групите с различен стимулационен протокол по процент бременности

Данните от направения анализ сочат, че използването на по-агресивни стимулационни подходи при жени с НЯР, каквито често са жените над 40 г. възраст, води



до незначимо увеличаване на СБЯ. Вероятно поради високата честота на анеуплоидите сред същевременно малкия брой добити яйцеклетки, процентът клинични бременности в тази възрастова група остава незадоволителен (Фиг. 58).

Отлагането на забременяването при жените е трайна демографска тенденция не само в България, но и в западния свят и Америка (272). Пряко следствие от тази негативна тенденция е нарастването на делът на жените с НЯР и СЯО на КОХ при лечението на стерилитет. В този контекст управлението на СЯО се откроява като основно предизвикателство пред специалистите по репродуктивна медицина. В отговор на това предизвикателство са и дългогодишните търсения на адекватни мероприятия за управление на СЯО.

Към момента няма достатъчно данни, които да докажат предимството на един или друг подход за подобряване изхода от АРТ при тези пациенти (10-15). Сравняването на различни **стимулационни протоколи** и подходи – къс протокол с дълъг протокол (324), протокол с антагонист на гонадолиберина (316), лека стимулация с кломифен цитрат (326), сравнение на дълъг протокол с протокол с антагонист (327), прилагането на естествен цикъл без стимулация (195), не отчитат статистически значимо предимство по отношение на пациентите със СЯО.

Сравнението на различни стимулационни подходи – от по-агресивен към по-лек и анализът на получените резултати в различни възрастови групи в нашето проучване, обаче, ни позволяват да отчетем достоверни различия и значими тенденции по отношение на яйчниковия отговор на стимулация и изхода от АРТ. Резултатите ни позволяват да отдиференцираме оптималния стимулационен подход във всяка възрастова група.

Анализът на получените данни сочи, че използването на по-агресивни стимулационни подходи, е свързан с добиването на статистически достоверно по-голям СБЯ във всяка от изследваните възрастови групи.

В групата на най-младите жени – **до 30 г.** този резултат е без значение за изхода от АРТ – независимо от силата на стимулацията, вкл. и СЦ и респ. СБЯ, процентът клинични бременности е еднакво висок, ок. 50%. Това се дължи на факта, че в тази възрастова група е много нисък процентът на овоцитите с хромозомни дефекти и енергийни дефицити и почти всяка добита яйцеклетка е с потенциал да предопредели развитието на здрав ембрион.

С напредването на възрастта на жените, обаче, намаляването на СБЯ се отразява негативно на изхода от АРТ, вероятно поради нарастване на делът на яйцеклетките с хромозомни дефекти (65-70). Това се наблюдава още в групата на жените между **31 и 34 г.**, при които СЦ е с достоверно по-нисък процент бременности в сравнение с другите два стимулационни подхода. Добрите резултати при прилагането на лимитиран цикъл в тази група се обясняват с добрия ЯР и добиването средно на над 5 яйцеклетки, което при тази все още млада възраст предполага висок шанс за бременност.

В следващата възрастова група – **34 – 39 г.**, наблюдаваме строга корелация между намаляването на СБЯ при прилагането на трите подхода, съответно от по-агресивен към

естествен, без медикаменти и респективно тенденция на намаляване на процента на клиничните бременности. Феноменът на компенсиране на малкия брой добити яйцеклетки от тяхното добро качество и ниска честота на анеуплоидиите, характерно за по-младата възраст, тук вече не се наблюдава. Въпреки, че СБЯ не се отличава чувствително от предходната възрастова група, процентът на клиничните бременности е значимо по-малък и намалява с намаляване на средния им брой. Отчетените резултати се свързват с нарастване на дела на яйцеклетките с хромозомни дефекти до ок. 50% и намаляване на енергийния им потенциал. В тази възрастова група, именно, се откроява необходимостта от по-агресивни стимулационни подходи с цел получаване на колкото се може повече яйцеклетки за увеличаване на шанса за бременност.

Във възрастовата група на жените над 40 г. е налице СЯО, независимо от стимулацията. Дори и при засилването на стимулацията, поради добиването на критично малък СБЯ – до 5 и поради високата възраст, свързана с висока честота на хромозомните дефекти на яйцеклетките – над 80%, процентът на клиничните бременности е сравнимо нисък, едва 15%.

Данните от анализа на ефективността от прилагането на различни **стимулационни подходи** в различните възрастови групи сочи, че използването на по-агресивни подходи е от изключително значение при жените във възрастовата група 34 – 39 г. Това е групата на жените, при които започват процеси на физиологично, свързано с възрастта намаляване на ЯР, от една страна, и от друга – на значимо нарастване на честотата на хромозомните дефекти и анеуплоидиите в яйцеклетките и намаляване на техния енергиен потенциал, т.е. паралелни процеси на „яйчниково остаряване“ в качествен и количествен аспект. Това прави всяка добита яйцеклетка при КОХ особено ценна. Същевременно, поради различни културни и обществено-икономически причини, пациентките в тази възрастова група заемат най-голям дял сред лекуваните за стерилитет – 34% (Фиг. 81). Именно тази ситуация налага търсенето на оптимални подходи за лечението на стерилитета при тях и предлагането на мерки за подобряване на шансът им за бременност и раждане на дете.

#### **IV. 4. 2. Анализ на зависимостта между дозите на използваните медикаменти за стимулация при ККОХ върху яйчниковия отговор и изхода от АРТ.**

Целта на настоящото изследване е да се установи зависимостта между увеличаването на дозите на гонадотропните медикаменти при прилагане на ККОХ и яйчниковия отговор, от една страна, и влиянието на този подход върху качеството на добитите яйцеклетки, чрез установяване на делът на атретичните яйцеклетки във всяка група, от друга.

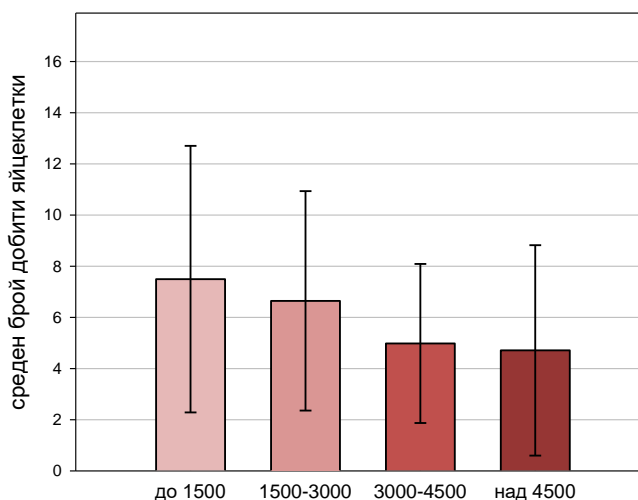
Най-често използваните общи дози за стимулация са 1500 – 3000 Е гонадотропини, което при средна продължителност на стимулацията 10 дни предопределя дневна доза между 150 – 300 Е гонадотропни хормони. Такива дози на медикаментите са използвани при 54% от изследваните стимулационни протоколи. При 25 % от пациентите са използвани по-ниски дози за стимулация до ок. 150 Е/дн. или до 1500 Е на гонадотропните медикаменти за целия цикъл на стимулация. В много по-малка част – 18,2% се е наложило използване на над 300 Е дневна доза за стимулация или общо 3000 – 4500 Е на гонадотропните медикаменти. Едва при 2,6% е приложена много

агресивна стимулация с над 450 Е дневна доза на гонадотропините или над 4500 Е гонадотропини за целия стимулационен цикъл.

Направеният анализ по отношение на СБЯ, добити при прилагането на различни дози на гонадотропните медикаменти, сочи статистически достоверно намаляване на СБЯ с увеличаването на количеството на използваните гонадотропини ( $H = 49.2$ ;  $p < 0.001$ ), особено що се касае до сравнението между дозите под и над 3000 Е (Табл. 59, Фиг. 59).

Табл. 59. Основни статистически показатели на СБЯ при групите според дозите FSH

доза FSH	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
до 1500	374	0	27	7.5	0.27	5.2	7.0
1500-3000	802	0	24	6.6	0.15	4.3	6.0
3000-4500	270	0	16	5.0	0.19	3.1	4.5
над 4500	38	0	16	4.7	0.67	4.1	3.5



Фиг. 59. Сравнение между групите според дозите FSH по СБЯ

Изборът на начални дози за стимулация, тяхната промяна в хода на стимулационния цикъл и общата крайна доза на използваните гонадотропини, са базирани на медицински критерии и стандарти, а именно: изходни параметри на ЯР, възраст, предшестващ отговор на КОХ и динамика на настоящия отговор и оптимизиране на дневните дози в хода на стимулацията.

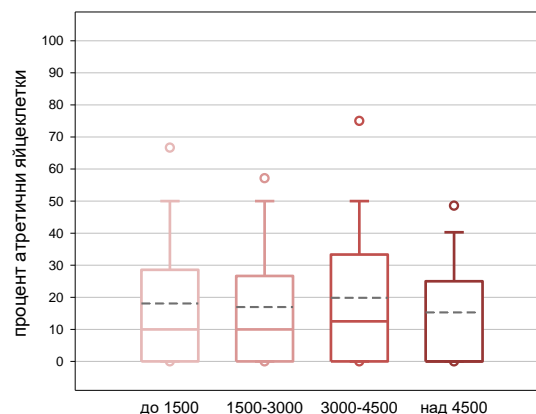
При така заложените принципи, добиването на по-малък брой яйцеклетки с увеличаването на дозите на прилаганите гонадотропини, се обяснява с НЯР при пациентките, при които са използвани. Данните за НЯР, СЯО при предшестваща стимулация и слаб начален отговор при настоящата стимулация са причина да се използват по-високи дози на стимулиращите агенти.

Анализът на данните по отношение на влиянието на нарастващите дози на гонадотропините върху качеството на яйцеклетките е оценено чрез изследване на дялът на атретичните яйцеклетки в групите с различни количества на прилаганите медикаменти (Табл. 60). Данните сочат по безспорен начин, че нарастването на дозите на прилаганите гонадотропини не увеличава дялът на атретичните яйцеклетки (Фиг. 60) – той остава постоянен в четирите групи, между 15% и 20%, без достоверна разлика ( $H$

$= 1.69; p = 0.640$ ). Това ни позволява да заключим, че високите дози на гонадотропините не компрометират качеството на яйцеклетките.

Табл. 60. Основни статистически показатели на СБЯ при групите според дозите FSH

доза FSH	n	min	max	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	SD	Me
до 1500	365	0	100	18.1	1.23	23.6	10.0
1500-3000	790	0	100	17.0	0.77	21.8	10.0
3000-4500	264	0	100	19.9	1.54	25.0	12.5
над 4500	34	0	100	15.3	3.79	22.1	0.0



Фиг. 60. Сравнение между групите според дозите FSH по СБЯ

От така проведеня анализ на данните по отношение на влиянието на използваните **доза на гонадотропините за стимулация** върху яйчниковия отговор не само в количествен, но и в качествен аспект, можем да заключим, че увеличаването на дозите на гонадотропините за стимулация не води до общо увеличаване на броя на добитите яйцеклетки при КОХ - СБЯ е функция на количествения ЯР. Увеличаването на дозите на стимулиращите агенти позволява да се получи максималния брой яйцеклетки, които ЯР при конкретния пациент позволява. Доколкото броят на добитите яйцеклетки предопределя в най-голяма степен изхода от АРТ, този подход е оправдан, особено с напредването на възрастта на жената и увеличаването на процента на яйцеклетките с хромозомни дефекти.

Прилагането на по-агресивни подходи за стимулация е оправдано и в контекста на установената липса на негативно влияние върху качеството на яйцеклетките, доказано със сравнимия дял на атретичните яйцеклетки, независимо от използваните дози за стимулация.

#### IV. 5. Анализ на приноса на подготвителни терапевтични подходи и съпътстващи техники за подобряване на изхода от АРТ при пациенти със СЯО на КОХ.

##### IV. 5.1. Физиотерапия/терапия (ФТ), ЯР и бременност.

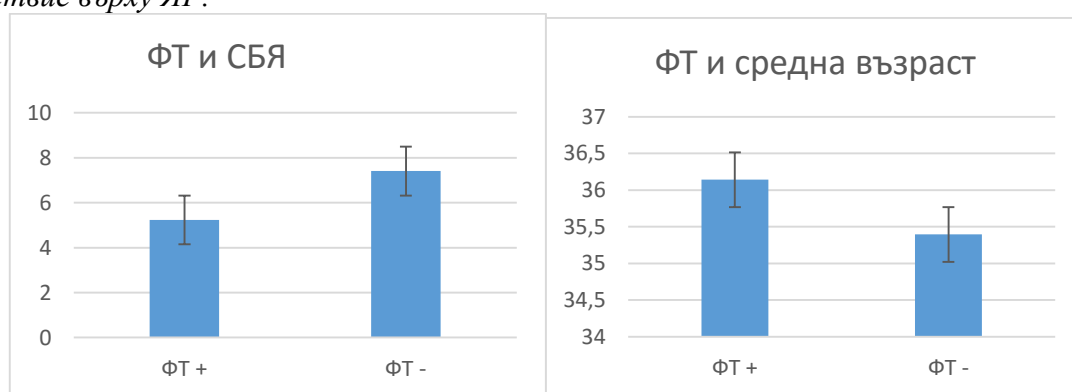
Процесите на фоликуло-, ово- и стероидогенеза са много динамични както в рамките на МЦ, така и през целия живот на жената, още от вътреутробното ѝ развитие до пост менопаузата (2 - 4). Тези процеси са детерминирани преди всичко от естествената женска физиология и генетични фактори. Много фактори свързани с начина на живот, обаче, също повлияват негативно яйчниковата функция, както доказахме в раздел IV.3. Това предполага, че би трябвало да има и фактори с благоприятен ефект върху

яйчниковата функция. Това ни кара да търсим подходи, които да повлияват положително яйчниковия потенциал. Очакванията са подходи, които са насочени към повишаване на кръвоснабдяването към органите в малкия таз и фоликуларния апарат от една страна или медикаменти с антиоксидантно действие, да оказват благоприятно въздействие както върху количествения, така и върху качествения потенциал на яйчника.

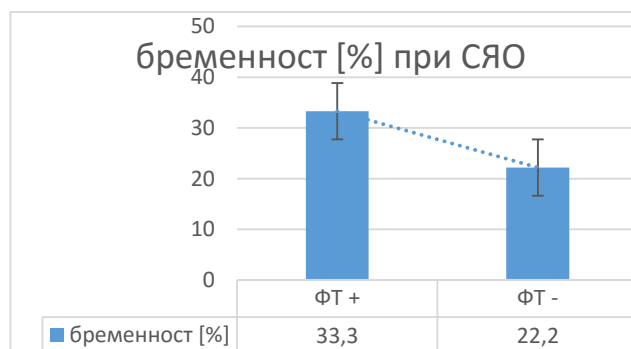
В тази връзка в проучването е изследвано комбинираното въздействие на набор от физиотерапевтични процедури и комбинация от витамини и микроелементи с антиоксидантно действие върху броя на добитите при КОХ яйцеклетки и процента бременности. Изследван е ефектът на тази комбинация от мерки при 509 жени, при които е имало един или повече предшестващи неуспеха от АРТ, без да е отчетена причината за стерилитета.

Данните от направеното проучване сочат, че макар и да липсва статистически значима разлика, средната възраст в групата на жените, при които е приложен този подход – 36,1 г. спрямо 35,4 г. в другата група, тя е малко по-висока, което предполага НЯР, свързан с възрастта. Анализът отчита сигнификантно по-голям СБЯ в групата без подготовка с мероприятия за въздействие на яйчниковата функция, вероятно поради по-добър ЯР и по-младата възраст ( $p < 0.001$ ) (Фиг. 61).

Фиг. 61. Ефект на физиотерапевтични процедури и терапия с антиоксидантно действие върху ЯР.



Когато се изследва ефекта от тези въздействия върху изхода от АРТ в група на пациенти със СЯО на КОХ с добити по-малко от 5 яйцеклетки, се отчита ясна тенденцията на увеличаване на успеваемостта при прилагането им (Фиг. 62), макар и без достоверни различия в процента на постигнатите клинични бременности ( $p = 0.961$ ).



Фиг. 62. Ефект на физиотерапевтични процедури и терапия с антиоксидантно действие върху % бременности при жени със СЯО.

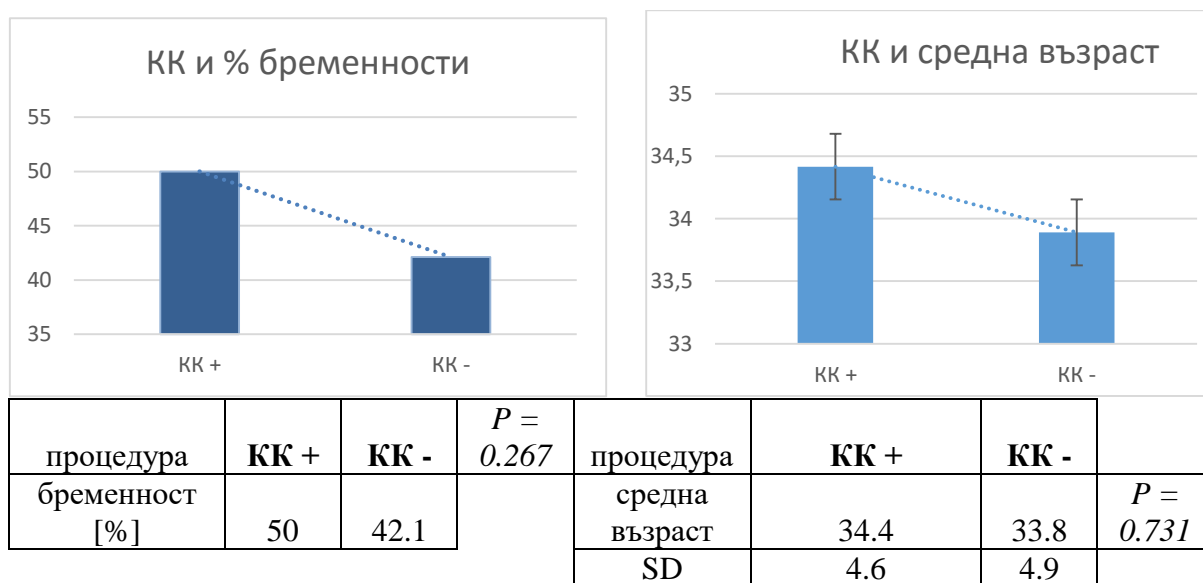
#### IV. 5.2. Ко-култивиране, ЯР и бременност.

Ефектът на култивирането на автоложни ендометриални клетки, изолирани от ендометриума на жената в предшестващия стимулацията цикъл и използването им като по-оптимална среда, върху която да се култивират ембрионите до трансферирането им, е обект на проучвания от години (346, 347). На тази естествена среда се възлага да подобри енергийния потенциал и метаболизма на яйцеклетката, който е намален поради възраст или дълги причини. Към този ефект се очаква да се насложи положителен ефект и от провокираните от влизането с катетъра за биопсия на ендометриума микролезии, на които се възлага да провокират пролиферация на свеж ендометриум в следващия цикъл и да се подобрят условията за имплантация.

При пациентите със СЯО, когато обичайно се получават малък брой ембриони, е критично важно всички условия, които могат до повлияят потенциала на ембриона за имплантация, да бъдат оптимизирани.

Техниката Ко-култивиране е приложена при 87 жени и е отчетен ефектът ѝ върху процента постигнати бременности (Фиг. 63).

Анализът на данните сочи липса на статистически достоверни различия по отношение на средната възраст на жените и на процента постигнати бременности в групите с приложено Ко-култивиране и без техниката. Налице е, обаче, ясна тенденция на по-висок процент постигнати бременности при прилагането му въпреки по-високата средна възраст в групата, в които е приложено.



Фиг. 63. Ко-култивиране и бременност.

Данни на проучване нашия екип върху 284 преимплантационни ембриона при 20 жени и сравняване на качеството им на ден 3 с и без прилагане на Ко-култивиране, показват сигнификантно по-голям процент на ембрионите с добро качество след прилагане на техниката (356).

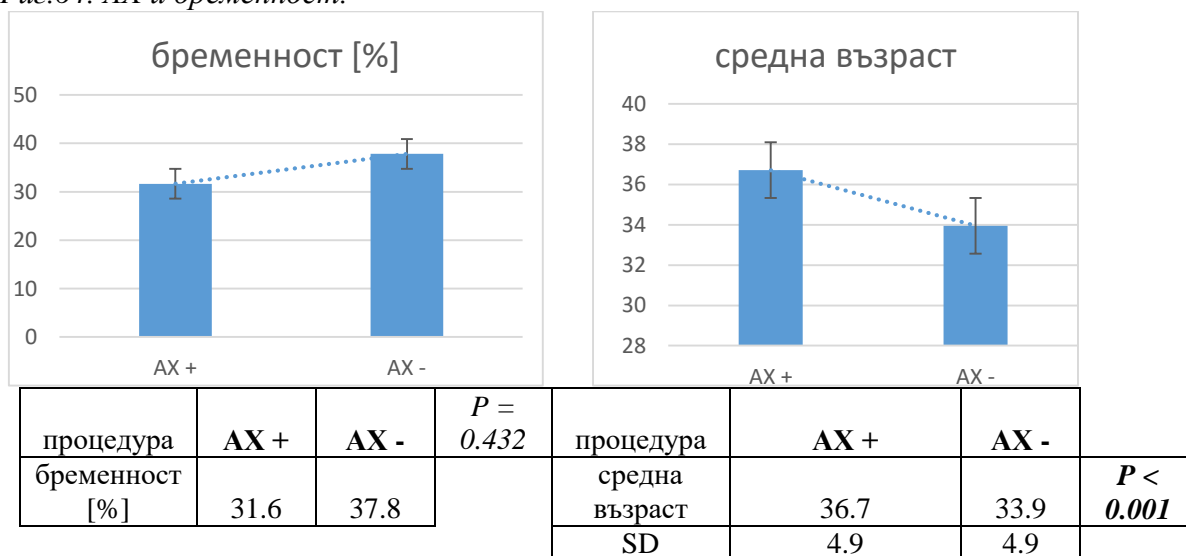
#### IV. 5.3. Асистиран хетчинг (АХ), ЯР и бременност.

Асистираният хетчинг е процедура, при която изкуствено се изтънява или пробива зона пелуцида, като най-прилаганата техника е с лазер. Ефектът на техниката е все още спорен (340). Препоръчителна е при: пациенти с по-висока репродуктивна възраст > 35 г., високи нива на ФСХ, удебелена зона пелуцида (341).

Доколкото част от възприетите индикации се припокриват с диагнозата на НЯР, в настоящото проучване е анализирана зависимостта между прилагането на тази техника и изхода от КОХ като цяло (Фиг. 64) и в частност при пациентите със СЯО (Фиг. 65).

Данните от проведените изследвания сочат, че при статистически по-висока възраст на пациентите с приложен АХ, процентът клинични бременности в двете групи е без достоверни различия. Този резултат потвърждава ефективността на техниката при по-възрастни пациенти, които обичайно са с по-слаб отговор на стимулация и често по-дебела зона пелуцида. АХ вероятно допринася за изравняването на шансовете им за бременност в сравнение с по-младите жени.

Фиг.64. АХ и бременност.

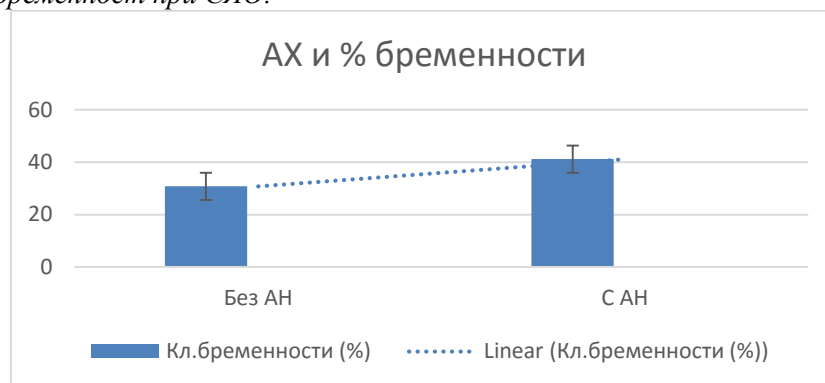


При изследване на 125 жени на възраст до 35г. със СЯО и добити под 5 яйцеклетки след КОХ и ефекта от прилагането на АХ, получаваме статистически несигнификантни, но изразени различия в процента на постигнатите клинични бременности при приложен АХ (Табл. 64, Фиг. 79), т.е. не се установява предимство на прилагането му при младите жени със СЯО.

Табл.64. АХ и бременност при СЯО.

	Без АХ	С АХ	различия
n	91	34	
Средна възраст	31.4 г.	31.5 г.	NS
СБЯ	3.03	3.1	NS
Среден брой трансферирани ембриони	2.36	2.26	NS
Кл. бременности/ЕТ (%)	29/91 (30.77%)	14/34 (41.17%)	NS

Фиг. 65. АХ и бременност при СЯО.



#### IV. 5.3. Ден на ембриотрансфер, ЯР и бременност.

Изборът на ден за трансфериране на ембриони обратно в маточната кухина се подчинява на няколко принципа – от една страна стремеж ембрионите да се трансферират максимално рано в естествената си и оптимална среда за развитие (334) и от друга да се селектира най-добрия по морфологични критерии и темп и характер на делене ембрион (351), което изисква повече дни наблюдение.

Анализ на 221 IVF/ICSI цикъла с получени 1 или 2 ембриона за трансфер, отчете достоверни различия в процента на клиничните бременности в групите с различен ден на ЕТ. Средната възраст на изследваните пациентки е 37.1 г., без статистически достоверна разлика. Това са пациенти с малък брой добити яйцеклетки след КОХ – СБЯ 3,6 и респ. малък брой ембриони за трансфер - 1,5. Поради малкият брой на ембрионите, трансферът е неселективен.

По отношение на деня на извършване на ЕТ, пациентките са разделени на 3 групи – с ЕТ на 2-ри (n=30), на 3-ти (n=165) и на 5-ти ден (n=26). Отчетен е имплантационният индекс и процента клинични бременности в трите изследвани групи (Табл. 61).

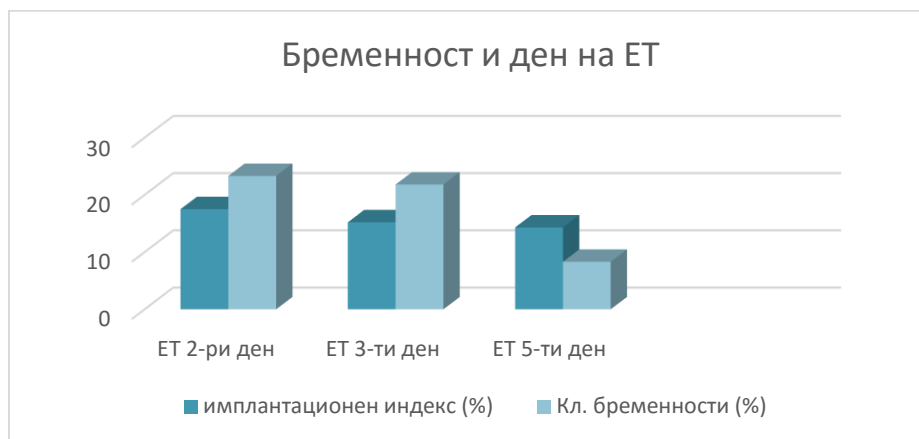
Табл. 61. Изход от АРТ в зависимост от деня на ЕТ.

	ЕТ 2-ри ден	ЕТ 3-ти ден	ЕТ 5-ти ден	резултати
n	30	165	26	
Среден брой трансферирани ембриони	1.3	1.5	1.7	NS
Имплантационен индекс (%)	17.5%	15.2%	14.3%	$p < 0.0001$
Клинични бременности/ЕТ (%)	7/30 (23.3%)	36/165 (21.8%)	8.3%	$p < 0.0001$

Получените резултати отчитат статистически достоверна разлика в процента на имплантация и на постигнатите клинични бременности в зависимост от деня на ЕТ при неселективен ЕТ на малък брой ембриони (до 2) (Фиг. 66). В групата на пациентите с ЕТ на 5-ти ден е отчетено достоверно по-голям процент (46%) на не извършените ЕТ поради стоп в развитието на ембрионите, което представлява естествена селекция. Отчетените



результати сочат по-добър изход от АРТ при по-ранен ден на ЕТ при пациенти със СЯО и малък брой получени ембриони, въпреки че при пациентите с ЕТ на 5-ти ден е направена своеобразна селекция, чрез отпадане на голяма част от ембрионите без потенциал поради стоп в развитието им. ЕТ на 2-ри ден се оказва най-перспективен и средство на избор за пациентите с малък брой ембриони.



Фиг. 66. Процент бременности и имплантационен индекс в зависимост от деня на ЕТ.

НЯР остава главното предизвикателство пред специалистите по репродуктивна медицина, доколкото изходът от АРТ е свързан освен с възрастта на жената, главно с броя на добитите яйцеклетки при КОХ (350). За това нашите усилия са насочени към намирането на подходи за увеличаване на броя на добитите яйцеклетки, доколкото е възможно, от една страна, но същевременно и към подобряване на тяхното качество и условията за имплантация на получените ембриони, доколкото критично малкият им брой ги прави много ценен за изхода.

Анализът на данните по отношение на въздействието на различни подходи върху яйчниковия отговор и изхода от IVF/ICSI процедурите не показва достоверни доказателства за предимството на една или друга техника за отчетливо повлияване на ЯР, отговора на КОХ и изхода от АРТ.

Въпреки това, при изследваните подходи се наблюдават тенденции, които са обещаващи. При прецизирането на индикациите за прилагането им и сравняването им в хомогенни и по-големи групи, а не в общата група на пациентите, лекувани за стерилитет, резултатите биха могли да достигнат достоверна значимост.

По отношение на прилагането на **физиотерапевтични процедури и хранителни добавки**, прави впечатление, че при липса на статистически значима разлика във възрастта на жените и при сигнификантно по-висок СБЯ след КОХ в групата на жените без приложени такива процедури, се наблюдава изразена тенденция на по-висок процент бременности при прилагането на ФТ и хранителни добавки при регистриран по-малък ЯР. Тези данни предполагат, че проведените процедури и терапия имат положително въздействие върху качеството на яйцеклетките и вероятно имплантационните условия и подобрява шанса за бременност. Това налага извода, че при жени със СЯО, прилагането на този подход благоприятства изхода от АРТ.

По отношение на прилагането на **Ко-култивиране** аналогично се наблюдава подчертана тенденция на постигнати по-висок процент клинични бременности в групата на жените с приложена такава техника, макар без статистическа достоверност на данните, при по-висока средна възраст в тази група. Ефективността на тази техника е по-голяма, когато има възможност ембрионите да се култивират по-дълго време, т.е. когато има повече ембриони и се изчаква селектирането им, доколкото тя има за цел да оптимизира условията за развитие на ембрионите и да преодолее несъвършенствата на ин витро условията и средите за култивиране (346 – 348).

Прилагането на **АХ** не води до достоверни различия по отношение на постигнатите клинични бременности в групи от жени със статистически значима разлика в средната възраст. Резултатите по отношение бременност при по-възрастни пациенти са сравними с тези с по-млади жени при прилагане на АХ, т.е. подобрява условията за бременност с възрастта. При пациентките под 35 г. с получени малко яйцеклетки при КОХ и респ. ембриони, техниката не дава сигнификатно предимство, въпреки, че отново е налице положителна тенденция, т.е. АХ не е техника за преодоляване на СЯО сам по себе си. Тя по-скоро има предимства и повишава шанса за бременност при жените с напредване на възрастта. Тези резултати са в унисон с възприетите критерии за прилагане на АХ, а именно: възраст над 35 г., високи нива на ФСХ и задебелена зона на зона пелуцида и/или предшестващи неуспешни опити (342).

В потвърждение на литературните данни (334), нашите резултати сочат статистически достоверно предимство на ранният **ЕТ на ден 2-ри** пред ЕТ на ден 3-ти или 5-ти при пациенти със СЯО на КОХ и малък брой ембриони. Това означава, че най-добрата среда за ембрионите се оказва естествената, а не субоптималната ин-витро среда. При малък брой ембриони, когато сме лишени от възможността за ембриоселекция, ЕТ на ранен ден е средство на избор.

Всеки един от предложените подходи има, макар и не винаги достоверен, принос към подобряване на резултатите при АРТ. Прилагането им самостоятелно или в комбинация, когато не са налице контраиндикации, повлиява благоприятно резултатите при пациентите със СЯО.

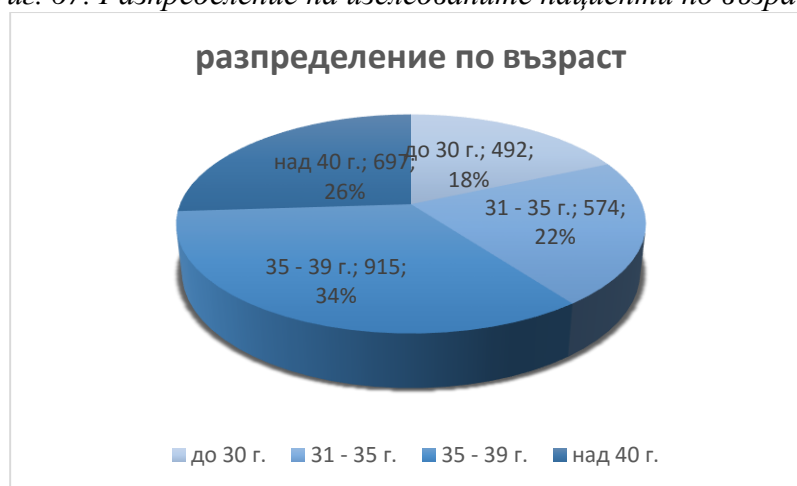
НЯР е състояние, което чувствително намалява шанса за бременност както спонтанно, така и при АРТ. Това са необратими процеси в яйчниковата функция, които очаквано, не можем съществено да повлияем с една или друга техника. Направените анализи показват тенденции, които биха могли да залегнат в основата на проспективни проучвания и да се развият, чрез разработването на строги критерии и индикации за прилагането им и формиране на ясни групи за по-достоверно сравнение на резултатите.

### Алгоритъм за управление на яйчниковия отговор на стимулация

От така направения анализ на данните в дисертационния труд, може да се изведе следният **Алгоритъм за управление на яйчниковия отговор на хормонална стимулация** за целите на АРТ (Табл. 62).

Алгоритъмът е изведен на базата на оценката на ефективността на различните видове стимулационни подходи и съпътстващи терапевтични мерки и лабораторни техники върху яйчниковия отговор на стимулация с гонадотропини и шанса за бременност. Ефективността на всяка от мерките е разгледана в различните възрастови групи (Фиг. 67) и според данните за яйчниковия резерв. За всяка от сформираните групи е предложен набор от оптимални мерки, които биха довели до най-добър отговор на стимулация и най-висок шанс за бременност.

Фиг. 67. Разпределение на изследваните пациенти по възраст.



В най-младата възрастова група на жените **до 30 г.**, за постигане на оптимален брой яйцеклетки, се препоръчва преди всичко ККОХ и с по-слаб, но задоволителен ефект – лимитиран цикъл или СЦ, поради добрия потенциал на яйцеклетките. Допълнителните техники не са от решаващо значение за яйчниковия отговор и изхода от АРТ и прилагането им се определя от наличието на други индикации. При данни за редуциран ЯР в тази група, се препоръчва по-агресивна стимулация за получаване на максимален брой яйцеклетки, като допълнителните техники биха благоприятствали яйчниковия отговор и имплантацията и са препоръчителни.

Във възрастовата група **31 – 34 г.** изводите и препоръките са в същата посока като в предходната група, като значимостта на агресивната стимулацията, особено при данни за редуциран яйчников резерв, нараства. Добиването на колкото се може повече яйцеклетки е вече значимо, доколкото нараства делът на атретичните от тях и тези с хромозомни дефекти.

Най-съществената част от пациентите – 34%, попадат във възрастовата група **35 – 39 г.** Това е и възрастта, в която процесите на яйчниково остаряване, проявени с нарастване на дела на атретичните яйцеклетки и тези с хромозомни дефекти и с енергийна недостатъчност, са вече изразени и честотата на срещане на тазово-възпалителна болест е по-голяма. Това е групата, в която все още е възможно, с

прилагането на по-агресивна стимулация и оптимална подготовка на яйчниците за подобряване на обменните процеси в тях, да се получат задоволителен брой и качество на яйцеклетките, с по-ограничен ефект при данни за НЯР. Всяка съпътстваща техника, която допълнително оптимизира условията за имплантация и мъжкия фактор, увеличава шанса за бременност.

Представените препоръчителни мерки в горната възрастова група, се отнасят и за групата на жените **над 40 г.** с добър ЯР. Поради високият процент на яйцеклетките с хромозомни дефекти и анеуплоидии, обаче, резултатите са незадоволителни – процент на клиничните бременности под 15. Що се касае до жените с данни за редуциран ЯР над 40 г., никой от предложените подходи не дава предимство и шансът за бременност е изключително малък. В тази група е необходимо да се обсъди вкл. отказ от процедури или използването на донорски яйцеклетки.

**Табл.62. Алгоритъм за управление на яйчниковия отговор на стимулация**

МЕРКИ ВЪЗРАСТ И ЯР		ККО Х	Лимитиран цикъл	СЦ	ФТ	Ко- култив иране	DHE А анти оксид анти	ЕТ на 2- ри ден
< 30 г.	Добър ЯР	++	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	НЯР	++	+		+	+	+	+
31 – 34 г.	Добър ЯР	++	+		+/-	+/-	+/-	+/-
	НЯР	++			+	+	+	+
35 – 39 г.	Добър ЯР	++			+	+	+	+
	НЯР	++			+	+	+	+
> 40 г.	Добър ЯР	++			+	+	+	+
	НЯР	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+
донорски яйцеклетки/отказ от процедури								

Легенда към табл. 66:

++ - силно препоръчителен подход;

+ - подход с добри резултати;

+/- подход без доказан ефект върху яйчниковия отговор, трябва да се прилага съобразно наличието на други индикации

Забележка: За оптимизиране процесите на оплождане, развитие *in vitro* на ембрионите, ЕТ и имплантацията се прилагат набор от допълнителни мерки според наличието на индикации: IMSI, MACS, Spindle View, наблюдение на ембрионите в ембриоскоп, добавяне на среди със специфични характеристики за подобряване на оплождането и темповете на делене на ембрионите.

## V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Съвременните обществено-икономически и културни условия и свързаното с тях отлагане на репродукцията, увеличава възрастта на жената за реализиране на репродуктивните ѝ планове и за раждане на последващо дете. Като следствие от тези тенденции, намаленият яйчников резерв и слабият отговор на КОХ са все по-често наблюдавани в съвременното лечение на стерилитет и същевременно най-голямото предизвикателство пред специалистите по репродуктивна медицина.

Една от целите на дисертационния труд е да изследва проявленията на НЯР и най-точните маркери за оценка на яйчниковия резерв и своевременна оценка на точния потенциал на яйчниците и респективно шанса за бременност при всяка жена.

Изследването и отдиференцирането на факторите, оказващи негативно въздействие върху яйчниковия резерв, може да послужи като основа за набелязване на мерки за превенция на негативните промени в репродуктивния апарат на жената, чрез промяна в начина на живот. Данните за негативното влияние на тютюнопушенето, наднорменото тегло, прекараните възпалителни процеси в малкия таз и отлагането на репродуктивните планове са безспорни и убедителни.

Възрастта се откроява по убедителен начин като главен предопределящ изхода от АРТ фактор. Проявленията на НЯР при младите жени са с далеч по-добра прогноза в сравнение с шанса за бременност при жените в напреднала възраст, дори при нормален ЯР. Доказва се по безспорен начин, че АРТ не са средство за преодоляване на яйчниковото остаряване.

Изследването на ефикасността на различните стимулационни подходи при пациенти с различен ЯР и възраст, позволява изработването на алгоритъм за своевременно предлагане на оптимален подход за лечение на стерилитет във всеки конкретен случай, без излишна загуба на време, средства и разочарования.

При пациентите с данни за НЯР е от изключително значение влагането на усилия в посока на оптимизиране на всички етапи, от които зависи изхода от АРТ. От една страна това са усилията за подобряване на яйчниковия отговор на стимулация в количествен и качествен аспект, чрез подготовката на яйчниците с антиоксидантна терапия и процедури за подобряване на кръвообръщението в малкия таз, каквито са физиотерапията и терапията с антиоксиданти. Решаващо значение за яйчниковия отговор има последващото прилагане на оптимални стимулационни подходи. Впоследствие от съществено значение са мероприятията за подобряване на имплантационните условия, чрез прилагането на техники като ко-култивиране, АХ, ЕТ на 2-ри ден.

Бъдещето е в техники за получаване на потентни млади репродуктивни клетки, носители на генетичния материал на индивида. Такива са например намиращите се още в експериментална фаза проучвания за продуциране на яйчникови фоликули или яйцеклетки от герминативни стволови клетки от костен мозък или периферна кръв, както и изолирането на овариални стволови клетки. Други разработки са насочени към автоложната или хетероложна митохондриална трансплантация за преодоляване на хромозомните дефекти и намаляването на енергийния потенциал на яйцеклетките.

## VI.ИЗВОДИ

1. Прогностичните маркери за ЯР показват различна сила и достоверност, като с прилагането на Коефициента на корелация на Spearman, с най-голяма сила се открояват възрастта на жената, БАФ и АМХ.
2. Предиктивна значимост по отношение на изхода от АРТ – процента на постигнатите клинични бременности, имат само възрастта на жената и БАФ.
3. Маркерите на ЯР, които в най-голяма степен прогнозироват СБЯ, са прогностични и по отношение на броя на добитите атретични яйцеклетки.
4. Делът на атретичните яйцеклетки остава постоянен и приблизително еднакъв от общия брой на добитите яйцеклетки във всяка от изследваните групи.
5. Факторите, свързани с начина на живот, могат чувствително да засегнат ЯР в качествен или количествен аспект:
  - a. Отклоненията в ИТМ както в посока на субоптимално, така и на наднормено тегло, са свързани със сигнификантно по-малък СБЯ, добити при КОХ. Нарастването на ИТМ корелира със статистически значимо нарастване на дела на атретичните яйцеклетки;
  - b. Тютюнопушенето засяга предимно качеството на яйцеклетките – наблюдава се сигнификантно по-висок процент на атретичните яйцеклетки при пушещите жени, а също и достоверно по-голям дял на пушещите жени в групата с добити изцяло атретични яйцеклетки;
  - c. Прекараните възпалителни процеси са свързани с достоверно по-малък СБЯ, добити след КОХ, вероятно чрез засягане на динамичните процеси на ово-, стероидо- и фоликулогенеза и кръвотока във фоликуларния апарат от факторите на възпалението;
  - d. Прекараните оперативни интервенции в малкия таз засягат негативно ЯР по отношение на всички показатели, със статистическа значимост в качествен аспект с по-голям дял на атретичните яйцеклетки;
  - e. Възрастта на жената се свързва с по-голяма честота на атретичните яйцеклетки, доказано от сигнификантно по-големия дял на жените над 40 г. в групата, в която всички добити при КОХ яйцеклетки са атретични.
6. СБЯ, добити след КОХ, показва достоверни различия при прилагането на трите вида стимулационен подход: ККОХ, лимитиран цикъл и СЦ, във всички възрастови групи – налице е по-малък СБЯ с намаляването на силата на стимулацията;
7. Средният процент бременности е без достоверни различия, независимо от прилагания вид стимулация, при жените под 30 г. и над 40 г. Тенденция на

намаляване на процента на клиничните бременности при прилагане на по-щадящи подходи се наблюдава във възрастовите групи 31 – 34 г. и 35 – 39 г. По-щадящите подходи са подходящи за най-младите жени, където доброто качество на яйцеклетките осигурява обуславя сравнимо висок процент на клиничните бременности, независимо от вида стимулация, както и при по-възрастните жени над 40 г., където никой от прилаганите стимулационни подходи не дава задоволителни резултати.

8. СЯО на ККОХ в различните възрастови групи е свързан с различен изход от АРТ – при младите жени до 35 г. се постигат много добри резултати - 34% процента клинични бременности, между 35 и 39 г. – 24,8%, а над 40 г. едва 10,5%, което предполага различно консултиране на пациентите със СЯО според възрастта им.
9. Увеличаването на дозите на използваните гонадотропини за стимулация при ККОХ, не води до увеличаване на броя на добитите яйцеклетки. СБЯ е функция на ЯР. Увеличаването на дозите на стимулационните агенти осигурява добиването на максималния брой яйцеклетки при наличния ЯР.
10. Увеличаването на дозите на използваните гонадотропини за стимулация при ККОХ не води до сигнификантно увеличение на дялът на атретичните яйцеклетки, независимо от различните индикации за увеличаване на дозите.
11. От допълнителните техники за подобряване на изхода от АРТ - физиотерапията и пероралната терапия с хранителни добавки, ко-култивирането и АХ, бележат тенденции да благоприятстват резултатите при жени с НЯР, макар и без статистическа достоверност на данните. Необходимо е разширяване и прецизиране на изследванията.
12. ЕТ на 2-ри ден е средство на избор при жени с малък брой ембриони, като се отчита сигнификантно по-висок процент на имплантация и на развиващите се клинични бременности. При липсата на условия за ембриоселекция поради малък брой на ембрионите, оптималната среда за тяхното развитие е естествената, което обяснява по-добрите резултати на ранния ЕТ.

## **VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

1. За пръв път у нас е разработен цялостно проблемът за акуратното прогнозиране на СЯО на КОХ, отчитане на факторите, предразполагащи неговото проявление и предлагането на алгоритъм за неговото управление.
2. Принос е достоверното сравняване на силата на прогностичната стойност на отделните маркери на ЯР в качествен и количествен аспект.
3. Доказана е връзката между фактори, свързани с начина на живот: възраст, ИТМ, тютюнопушене, възпалителни заболявания в малкия таз, оперативни интервенции и яйчниковия резерв – данни, които могат да послужат за превенция на НЯР.
4. Оригинален принос е изследването на честотата на получаване на атретични яйцеклетки след КОХ, като е доказана положителната им корелация с общия брой добити яйцеклетки и фактори, свързани с начина на живот като възраст, тютюнопушене, наднормено тегло и е отхвърлена по достоверен начин зависимостта им с увеличаването на дозите на използваните гонадотропини за стимулация.
5. Доказана е ползата от прилагане на щадящи подходи за стимулация само при млада и при напреднала репродуктивна възраст (над 40 г.), където по-агресивните стимулационни протоколи не дават статистически достоверно предимство.
6. Доказана е значимостта на прилагането на по-агресивни стимулационни подходи за получаване на по-голям брой яйцеклетки във възрастовата група 35 – 39 г., която е основният контингент на клиниките по стерилитет. Полагането на усилия за добиване на колкото се може повече яйцеклетки в условията на намаляващ качествен и количествен ЯР и увеличаване на честота на хромозомните дефекти в яйцеклетките, е от решаващо значение за изхода от АРТ в тази възрастова група.
7. Принос е доказването на предимството на ранния ЕТ при жени с малко ембриони.
8. Проучена е група от съпътстващи техники и терапия, с благоприятен ефект върху проявленията на СЯО, която може да залегне в бъдещи проучвания за оптимизиране на изхода от АРТ при пациенти с НЯР.
9. Принос е доказването на достоверни различия в шанса за бременност при жени със СЯО от различни възрастови групи – достоверно по-голям при жените до 35 г., задоволителен във възрастовата група 35-39 г. и незадоволителен над 40 г., данни, които предполагат различно консултиране на пациентите от различните групи за оптималните възможности пред тях.



## VIII. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД И УЧАСТИЯ

1. **Юнакова М.,** Валериева Е., Палабуюк О., Бочев И., Тимева Т., Щерев А. **Връзка между тубарния фактор като причина за стерилитет и яйчниковият отговор на контролирана овариална хиперстимулация** САГБАЛ „Д-р Щерев“, София, Сп. MedPost, бр. 15, Март 2016, стр. 12 – 15.
2. **Юнакова М.,** Антонова И., Бочев И., Тимева Т., Щерев А., **Влияние на начина на живот и възрастта върху репродуктивния капацитет на жената,** САГБАЛ „Д-р Щерев“, София, Сп. MedPost, бр. 10, Октомври 2015, стр. 56 – 61.
3. **Yunakova, M.,** Bochev, I., Bandreva, B., Timeva, T., Shterev, A. **Age is a prognostic factor for pregnancy even in patients with poor ovarian response (POR)** Ob/Gyn Hospital "Dr. Shterev", In Vitro Unit, Sofia, Bulgaria. Giornale Italiano di Osetrica e Ginecologia, Vol. XXXVI – n.1, Gennaio-Febbraio 2014, 297-299.
4. **Yunakova M.,** Bochev I., Antonova I., Timeva. T., Shterev, A., **Influence of lifestyle on the reproductive capacity of women,** Ob/Gyn Hospital “Dr. Shterev”, In Vitro Unit, Sofia, Bulgaria, Giornale Italiano di Osetrica e Ginecologia, Vol. XXXVI – n.1, Gennaio-Febbraio 2014, 300-304.
5. **Юнакова, М.,** Антонова, И., Андреева, П., Щерев, А. **Прогностична стойност на маркерите на яйчниковия резерв.** *Репродуктивно здраве*, 2010, №17, с. 23
6. **Юнакова, М.,** Андреева, П., Тимева, Т., Магунска, Н., Петкова, Л., Щерев, А. **Прогностична стойност на факторите за оценка на яйчниковия резерв.** *10 ти Национален конгрес по стерилитет, контрацепция, хормонозаместителна терапия и гинекологична ендоскопия с международно участие - Сол Несебър Ризот*, 2009.
7. **Юнакова, М.,** Савова, Д., Петкова, Л., Щерев, А., **Сравнение на изхода на КОХ с дълъг протокол с агонист и протокол с антагонист при жени със слаб яйчников отговор.** *9 ти Национален конгрес по стерилитет, контрацепция, хормонозаместителна терапия и гинекологична ендоскопия с международно участие - Ривиера*, 2008, ОС 09.
8. **Юнакова, М.,** Щерев, А., Савова, Д., Петкова, Л. **Оценка на приложението на минимална стимулация при лечение на стерилитет.** *8 ми Национален конгрес по стерилитет, контрацепция, хормонозаместителна терапия и гинекологична ендоскопия - Боровец*, 2007.
9. **L. Valkova,** T. Milachich, I. Antonova, T. Timeva, P. Andreeva, **M. Yunakova, A. Shterev, Influence of the embryo quality before vitrification on the result of frozen embryo transfer,** The 21<sup>st</sup> COGI, May 14 – 16, 2015, Frankfurt, Germany
10. **T. Timeva,** T. Milachich, M. Yunakova, L. Vulkova, I. Bochev, A. Shterev, **reconsideration of recommendations for natural cycle in ART,** The 21<sup>st</sup> COGI, May 14 – 16, 2015, Frankfurt, Germany